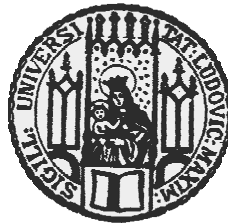


Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Dietrich Reinhardt

**Zelluläre und lösliche Komponenten der angeborenen Immunabwehr  
bei pädiatrischen Lungenerkrankungen**



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Veronica Marcos-Nickol  
aus  
Lübeck  
2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Giese

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. U. Kummer  
Prof. Dr. R. M. Huber

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. D. Hartl

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser,  
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2009

Meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Das angeborene Immunsystem der Lunge .....	5
1.1.1 Lösliche Faktoren.....	6
1.1.1.1 SP-D .....	6
1.1.1.2 sCD14 .....	9
1.1.1.3 IL-8.....	11
1.1.1.4 freie DNA .....	11
1.1.2 Zelluläre Faktoren .....	12
1.1.2.1 Neutrophile Granulozyten .....	12
1.1.2.2 Chemokinrezeptoren auf Neutrophilen Granulozyten .....	13
1.2 Lungenerkrankungen im Kindesalter.....	13
1.2.1 Pneumonie .....	13
1.2.2 Cystische Fibrose.....	14
1.2.3 Asthma.....	14
<b>2 Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1 Enzyme linked Immunosorbent Assay .....	17
3.1.1 ELISA für SP-D.....	17
3.1.2 ELISA für sCD14 .....	19
3.1.3 ELISA für human IL-8 .....	20
3.2 Messung der freien DNA.....	22
3.3 Zellkultur .....	22
3.3.1 Isolierung von Neutrophilen Granulozyten.....	22
3.3.2 Stimulation von Neutrophilen Granulozyten .....	24
3.4 Zelllyse.....	24
3.5 Quantitative Proteinbestimmung .....	25

3.6 Proteinpräzipitation.....	26
3.7 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse.....	26
3.8 Mikroskopie .....	29
3.9 Durchflusszytometrie .....	32
3.10 Patienten und gesunde Kontrollgruppe .....	33
3.10.1 Pneumonie.....	33
3.10.2 Cystische Fibrose .....	33
3.10.3 Asthma .....	34
3.10.4 Kontrollgruppe .....	34
3.11 Durchführung der bronchoalveolären Lavage .....	34
3.12 Statistik.....	35
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>36</b>
4.1 Lösliche Faktoren .....	36
4.1.1 SP-D .....	36
4.1.2 sCD14.....	38
4.1.3 IL-8 .....	43
4.1.4 freie DNA .....	45
4.1.5 Korrelationen .....	46
4.1.5.1 freie DNA zu SP-D .....	46
4.1.5.2 sCD14 in BALF zu Serum .....	48
4.2 Zelluläre Faktoren .....	50
4.2.1 Durchflusszytometrie Ergebnisse .....	50
4.2.2 Western Blot Ergebnisse .....	51
4.2.3 Mikroskopie Ergebnisse.....	54
<b>5 Diskussion</b>	<b>57</b>
5.1 Lösliche Faktoren .....	57
5.1.1 sCD14.....	57
5.1.2 SP-D .....	63
5.1.3 IL-8 .....	68
5.1.4 Freie DNA.....	68
5.2 Zelluläre Faktoren .....	70

5.2.1 CCR5.....	70
5.2.2 CXCR3 .....	71
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>95</b>
8.1 Abkürzungsverzeichnis .....	95
8.2 Abbildungsverzeichnis .....	98
8.3 Tabellenverzeichnis .....	100
8.4 Danksagung .....	101
8.5 Publikationen .....	102
8.6 Lebenslauf .....	103





# 1 Einleitung

## 1.1 Das angeborene Immunsystem der Lunge

Die Immunabwehr höherer Organismen ist ein komplexes System, das der Erkennung und Elimination mikrobieller Erreger dient, ohne dabei körpereigenes Gewebe anzugreifen. Man unterscheidet angeborenes und erworbenes Immunsystem. Die angeborenen Abwehrmechanismen sind jederzeit aktivierbar und vielschichtig miteinander verzahnt (121). Sie richten sich jedoch nicht spezifisch gegen den jeweiligen Erreger und bieten keinen Schutz gegen eine erneute Infektion. Die erworbenen Abwehrmechanismen sind adaptiv, also spezifisch, und werden erst nach Erregerkontakt aktiviert (23). Da die adaptive Immunantwort erst verzögert (nach vier bis sieben Tagen) eintritt, hat die angeborene Immunität eine entscheidende Funktion zur Eindämmung der Infektion.

Sowohl die erworbene, als auch die angeborene Immunabwehr umfasst zelluläre und lösliche Komponenten. Diese Arbeit befasst sich mit angeborenen Abwehrmechanismen der Lunge. Deshalb wird im Folgenden speziell auf zelluläre und lösliche Komponenten der angeborenen Immunität eingegangen.

**Lösliche Komponenten** des angeborenen Immunsystems (23) umfassen Proteine des

- Komplementsystems
- Akut-Phase-Proteine
- Zytokine
- Niedermolekulare Proteine, welche die bestimmte Strukturen auf mikrobiellen Oberflächen erkennen, um so eine Eliminierung von nicht-körpereigenen Molekülen zu ermöglichen (88).

Zu den **zellulären Komponenten** des angeborenen Immunsystems (23) gehören

- phagozytierende Zellen / Phagozyten (Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten),
- Zellen, die inflammatorische Mediatoren freisetzen (Basophile, Eosinophile und Mastzellen) und
- Natürliche Killerzellen.

Lungenerkrankungen zählen zu den führenden Morbiditäts- und Mortalitätsursachen weltweit (77; 78). Die Form der Lungenerkrankung und die Immunantwort des Betroffenen entscheiden über den Ausgang der Erkrankung (9; 96). Die Bekämpfung von Krankheitserregern in der **Lunge** stellt eine besondere Herausforderung für das Immunsystem dar. Dies hat folgende Gründe (75):

- Die zu verteidigende Oberfläche des respiratorischen Epithels ist mit über 150m<sup>2</sup> sehr groß.
- Täglich werden ca. 10.000 Liter Luft inhaliert.
- Die Anzahl an ortsansässigen Leukozyten zur sofortigen Infektabwehr ist relativ gering.
- Physikalische Barrieren wie z.B. Haut gibt es in der Lunge nicht. Die sehr dünne Schicht zwischen Alveolarraum und Kapillaren bietet keinen ausreichenden Schutz vor dem Eindringen von Krankheitserregern.

Die Koordination der Immunantwort der Lunge auf eine Bedrohung von außen wird von Lungenepithelzellen und den ortsständigen Alveolarmakrophagen ausgeführt (121). Sie schütten Zytokine und Chemokine aus, um Neutrophile Granulozyten und weitere inflammatorische Zellen anzulocken (75). Um den besonderen Bedürfnissen der Lunge gerecht zu werden, schützt sich die angeborene Immunabwehr durch lösliche Faktoren, welche eine schnelle und unmittelbare antimikrobielle Wirkung besitzen. In dieser Arbeit wurden als wichtige Vertreter der löslichen Faktoren Surfactant Protein D (SP-D), lösliches CD14 (sCD14) und Interleukin-8 (IL-8) bei pädiatrischen Lungenerkrankungen genauer untersucht.

## 1.1.1 Lösliche Faktoren

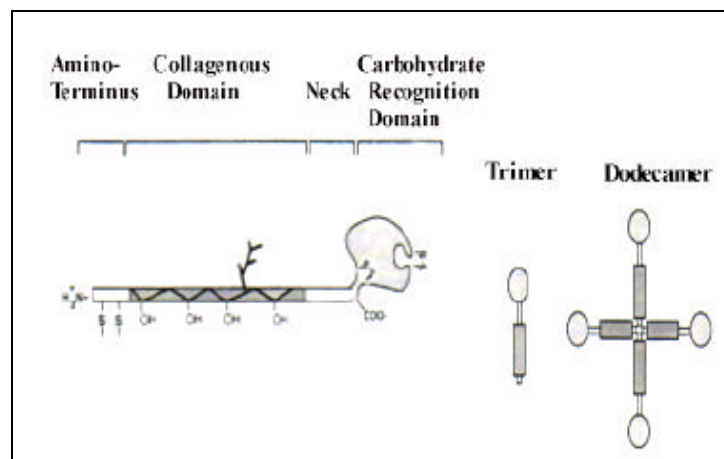
### 1.1.1.1 SP-D

Vor dem direkten Kontakt mit den Immunzellen der Lunge interagiert das inhalierte Pathogen mit einem Oberflächenfilm, der die gesamte Alveolarfläche bedeckt und als pulmonales „Surfactant“ („surface active agent“) bezeichnet wird. Surfactant besteht vorwiegend aus Phospholipiden (90%) und verschiedenen Proteinen (10%) (35; 75). Neben der Stabilisierung der Oberflächenspannung der Lungenbläschen während der Atmung (biophysikalische Funktion) spielt Surfactant eine wichtige Rolle bei der Abwehr infektiöser Erreger (immunologische Funktion) (35). Bisher wurden vier spezifische

Surfactant Proteine (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D) entdeckt (35). SP-B und SP-C sind hydrophobe Proteine, erleichtern die Verteilung der Oberflächenlipide und helfen die alveoläre Oberflächenspannung zu reduzieren (35). Im Gegensatz dazu, haben die hydrophilen Surfactant Proteine SP-A und SP-D vor allem eine Funktion bei der Immunabwehr von Mikroorganismen (18). Aufgrund ihrer Struktur gehören SP-D und SP-A zusammen mit dem im Serum vorkommenden MBP (mannose-binding protein) zur Familie der kollagenen kalziumabhängigen Lektine („Kollektine“) (18; 118).

**SP-D** wird in der Lunge von Typ II Alveolarzellen und Clara Zellen gebildet (109; 117). Andere Studien zeigten, dass SP-D auch von den Epithelzellen anderer muköser Oberflächen exprimiert wird, z.B. Gastrointestinaltrakt (29) und genitouteriner Takt (69), ebenso wie in Tränenflüssigkeit (79).

Die komplexe Quartärstruktur (Abb. 1-1), ein Dodecamer (ca. 520kDa), wird aus vier Trimeren gebildet, welche wiederum aus identischen Monomeren (ca. 43kDa) zusammengesetzt sind. Diese Monomere enthalten einen Aminotermius, einen kollagenen Anteil, einen Halsbereich und einen Kohlenhydrat-Erkennungsbereich (Carbohydrate Recognition Domain; CRD) (54; 74).



**Abbildung 1-1 Struktur des Surfactant Protein D (74)**

Die oligomere Struktur (Dodecamer) wird über Disulfidbrücken gesichert und ist wichtig für die Aktivität des Moleküls. Zhang et al. (122) zeigten im Rattenmodell, dass ein Mangel an oligomerisiertem SP-D zu einer Phospholipidakkumulation, Schaumzell- und Emphysembildung in der Lunge führt.

Die Ergebnisse verschiedener Studien weisen darauf hin, dass die CR Domäne dieses Moleküls in Anwesenheit von freiem Kalzium an Kohlenhydrat-Gruppen auf der Oberfläche von Mikroorganismen (Bakterien (95), Viren (64), Pilzen (68)) ebenso wie an freier DNA (87) und Allergenen (110) bindet, diese agglutiniert, obsonisiert und somit die Eliminierung durch Phagozyten fördert (40).

Bis jetzt sind drei Rezeptoren für SP-D bekannt, über welche es die Immunantwort körpereigener Fresszellen (Makrophagen und Granulozyten) modulieren kann (40):

- CD14/sCD14 (siehe unten)
- Signal inhibitory regulatory protein alpha (SIRPα) / CD91-Calreticulin
- Glycoprotein 340

In der folgenden Tabelle 1-1 sind einige **Funktionen** von SP-D aufgelistet:

<b>Antiinflammatorisch</b>	Regulation der inflammatorischen Antwort auf Mikroorganismen und mikrobielle Produkte
	Neutralisation von LPS
	Regulation von Oxidanzienmetabolismus in der Lunge
<b>Antimikrobiell</b>	Obsonisierung und verstärktes Töten von einigen Organismen
	Verminderte Internalisierung von einigen intrazellulären Pathogenen
	Verstärkte mikrobielle Agglutination und Clearance
	Verstärkte Entzündungsantwort auf Komplexe mit SP-D und Erregern
	Eingeschränktes mikrobielles Wachstum
<b>Immunmodulatorisch</b>	Verminderte Proliferation von Lymphozyten bei verschiedenen Mitogenen
	Veränderte Präsentation von Antigenen sensitivierten Zellen gegenüber
<b>Proinflammatorisch/ Reparatur</b>	Verstärkte gerichtete Migration von Phagozyten
	Veränderte Produktion von Metalloproteasen durch Makrophagen
<b>Surfactant Homöostase</b>	Normale zelluläre Aufnahme und Metabolisierung von Surfactantlipiden

**Tabelle 1-1 Funktionen von SP-D (17)**

Aufgrund der genannten Eigenschaften und Funktionen spielt das SP-D in der Immunabwehr eine entscheidende Rolle. Es wirkt dabei antiinflammatorisch, um Kollateralschäden der Lunge während der Aufnahme und Elimination von Pathogenen zu minimieren (64). Vorrangegangene Studien zeigten, dass SP-D Spiegel in der

bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) Hinweise auf die pulmonale Abwehrfunktion geben und möglicherweise als Marker bei entzündlichen Lungenerkrankungen geeignet sind (16; 34; 36; 37). Wir untersuchten deshalb SP-D Spiegel bei den Erkrankungen Pneumonie, Cystische Fibrose (CF) und Asthma im Kindesalter.

#### **1.1.1.2 sCD14**

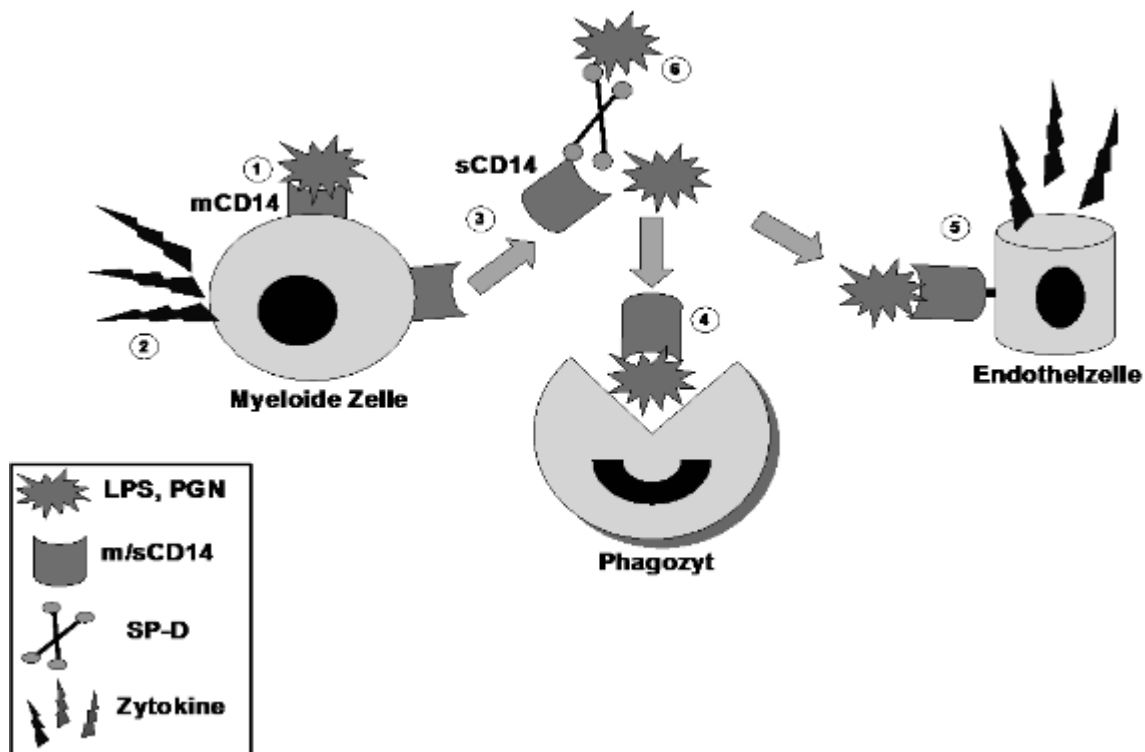
CD14 ist ein Differenzierungsantigen auf myeloiden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und B-Zellen (32; 55; 60), welches membrangebunden (mCD14; 55kDa) und in löslicher Form (sCD14; 48kDa) existiert. Auf peripheren Blutmonozyten werden ca. 50000-100000 CD14 Moleküle pro Zelle exprimiert (107). Auf peripheren Blutneutrophilen ist die Ausprägung vergleichsweise zehnmal niedriger (119). mCD14 ist über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker an der Zellmembran befestigt (43).

Es sind drei Möglichkeiten der Entstehung der löslichen Form bekannt:

- Konstitutive direkte Sezernierung (ohne GPI-Anker) (11)
- Proteolytische Abspaltung von der Membran bei Zellaktivierung (11; 43; 100)
- Lipolytische Abspaltung (8; 99)

CD14 dient als **Rezeptor** für Lipopolysaccharid (LPS) (120), ein Membranbestandteil von Gram-negativen Bakterien, aber auch für andere bakterielle Zellwandbestandteile wie Peptidoglykan von Gram-positiven Bakterien (88). Durch Kontakt mit diesen Molekülen wird CD14 transkriptionell hoch reguliert (61). CD14 fördert die Aufnahme von LPS durch Neutrophile Granulozyten und Monozyten, ein Effekt, der durch LBP (Lipopolysaccharide binding protein) katalysiert wird (104). Bei LPS-Exposition interagiert CD14 mit dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und führt über den MAPK (mitogen-activated-protein kinase) Weg direkt zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, -6, -8 und TNF $\alpha$  durch Monozyten und Makrophagen (19; 24). mCD14 ist also in der LPS-induzierten Zellaktivierung von Monozyten/Makrophagen involviert. sCD14 dagegen ist an der Neutralisierung von LPS und an der Aktivierung von mCD14-negativen Zellen beteiligt (z.B. Endothelzellen). Nach Binden von sCD14 reagieren diese in gleicher Weise wie mCD14-positive Zellen und unterstützen so die Immunantwort (30; 101).

Die folgende Abbildung 1-2 illustriert die wichtigsten Interaktionen und Funktionen von m/sCD14.



**Abbildung 1-2 mCD14 ist ein Oberflächenrezeptor auf myeloiden Zellen und bindet LPS, PGN und andere bakterielle Bestandteile (1). Es induziert die Aufnahme dieser Bestandteile und fördert die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen (2). CD14 wird bei Zellaktivierung von der Membran abgespalten und interagiert als lösliche Form (sCD14) ebenfalls mit bakteriellen Bestandteilen (3). sCD14 fördert ihre Aufnahme durch Phagozyten (4) und die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch CD14 negative Zellen (z.B. Endothelzellen) (5). SP-D kann sowohl bakterielle Bestandteile abfangen, als auch sCD14 binden und wirkt dadurch anti-inflammatorisch (6).**

CD14 ist ein Akute Phase Protein und eignet sich somit zur Charakterisierung von Inflamationsreaktionen (7). Bisherige Studien konnten zeigen, dass sich sCD14 Spiegel als Entzündungsparameter bei akuten und chronischen Erkrankungen eignet (84; 89; 102). Die Rolle von sCD14 bei den pädiatrischen Lungenerkrankungen Pneumonie, CF und Asthma soll ein Gegenstand dieser Arbeit sein.

### 1.1.1.3 IL-8

IL-8 ist ein Chemokin der CXC Familie. Als Chemokine bezeichnet man chemotaktisch wirkende Zytokine, die von vielen Zelltypen sezerniert werden können. Sie locken bei einer Entzündungsreaktion Leukozyten über Chemokinrezeptoren zum Ort des Geschehens (Chemotaxis). Chemokine spielen daher eine zentrale Rolle als Mediatoren bei der Regulation einer gerichteten Leukozytenwanderung und der dadurch ausgelösten Entzündungsprozessen.

IL-8 wird unter anderem von Epi- und Endothelzellen, T-Zellen und Makrophagen gebildet. Es spielt eine wichtige Rolle bei bakteriellen Entzündungen und rekrutiert **Neutrophile Granulozyten** in die Lunge (22). IL-8 zählt daher zu den proinflammatorischen Mediatoren und kann als Parameter für chronische Entzündungsprozesse in der Lunge gesehen werden.

### 1.1.1.4 freie DNA

Hohe Konzentrationen an freier DNA in der BALF sind Zeichen eines massiven **Zelluntergangs** in der Lunge. Bei diesem Zellzerfall werden DNA Fragmente in unphysiologischen Mengen in den Extrazellularraum freigesetzt. Die Menge der freien DNA kann als Maß für den Grad der Entzündung gesehen werden. Als weiteren Ursprung von freier DNA in der Lunge fanden Whitchurch et al. (114), dass bestimmte Lungenpathogene, wie *Pseudomonas aeruginosa* (ein Problemkeim bei CF) aktiv DNA in den Extrazellularraum sezernieren. Freie DNA macht den Schleim in der Lunge zäher, was die Clearance erschwert. Dieser zähe Schleim bietet einen optimalen Nährboden für die Ansiedelung und Vermehrung von Bakterien. Deshalb ist die Therapie mit DNase zur Verflüssigung des Schleimes ein zentraler Therapiepunkt bei CF. (94)

Hohe Konzentrationen an freier DNA in der BALF geben Hinweis auf eine neutrophile Entzündungsreaktion in der Lunge. Deshalb untersuchten wir die BALF von Kindern mit CF, Pneumonie und Asthma, sowie von Kontrollkindern, um Hinweise auf das Vorhandensein und Ausmaß einer neutrophilen Entzündungsreaktion bei diesen Gruppen zu erhalten.

## 1.1.2 Zelluläre Faktoren

### 1.1.2.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind mit 50 bis 80 Prozent die zahlenmäßig stärkste Fraktion der Leukozyten und sind **wichtige zelluläre Funktionsträger im unspezifischen Abwehrsystem** des Blutes. Eine Ansammlung dieser Zellen im beschädigten Gewebe ist eine normale physiologische Antwort mit dem Ziel eine Infektion zu bekämpfen (115). Neutrophile Granulozyten sind zur Phagozytose von Bakterien und Gewebstrümmern fähig und besitzen in ihrem Zytoplasma Granula, deren Inhalt sie bei Aktivierung ausschütten können (123). Die Granula werden eingeteilt in sekretorische, Gelatinase, spezifische und azurophile Granula. Sie enthalten Proteasen, wie Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3, außerdem finden sich Proteine, wie Lactoferrin und Lysozym, und verschiedene Komplementrezeptoren (91). Die genannten Granula werden zu unterschiedlichen Zeiten der entzündlichen Reaktion ausgeschüttet (91).

Neutrophile Granulozyten sind aber nicht nur nützliche Helfer der Immunabwehr, sondern eine exzessive Rekrutierung dieser Zellen kann den Gewebsschaden auch verschlimmern, die Heilung verzögern und in manchen Fällen sogar zum Tod des Individuums führen (115). Neutrophile Granulozyten produzieren über 40 hydrolytische Enzyme und verschiedene Oxidanzien, wie Superoxidanionen, Hydrogenperoxid, Hypochlorazid und Chloramine (5; 44; 112). Sie können jedoch nicht zwischen exogenen Mikroorganismen und körpereigenem Gewebe unterscheiden, was zu einer potentiell histolytischen Aktivität führen kann (5).

In der Lunge sind entzündliche Erkrankungen charakterisiert durch eine Ansammlung von Neutrophilen Granulozyten, von besonderer Bedeutung ist dies bei Patienten mit CF. Bei der chronischen Entzündung in der Lunge von CF- Patienten kommt es zu einer massiven Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten, welche jedoch veränderte Eigenschaften zeigen. Anstatt Bakterien zu töten, richten sich Proteasen wie Elastase und verschiedene Matrix Metalloproteasen (94) gegen körpereigenes Gewebe, was zu einer Degradation von Lungengewebe, zum zystischen Umbau und zu einem Funktionsverlust von Zellen führt.



### 1.1.2.2 Chemokinrezeptoren auf Neutrophilen Granulozyten

Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die aus sieben Transmembran-Domänen aufgebaut sind. Sie sind in der Lage Chemokine zu binden. Die meisten Chemokine binden an mehr als einen Rezeptor und die meisten Rezeptoren binden mehr als ein Chemokin, wodurch ein verflochtenes Netzwerk entsteht. (67)

Man unterscheidet hauptsächlich zwei Subtypen von Chemokinen (und deren Rezeptoren) (6):

- Die CXC oder  $\alpha$  Chemokine (Rezeptor: CXCR)
- Die CC oder  $\beta$  Chemokine (Rezeptor: CCR)

C steht für die Aminosäure Cystein und X für das Vorhandensein weiterer Aminosäuren. CXC Chemokine wirken vor allem auf Neutrophile Granulozyten, CC Chemokine auf viele Leukozyten Populationen wie z.B. Monozyten, T-Lymphozyten, Basophile und Eosinophile (6).

Funktionell unterteilt man Chemokine und Chemokinrezeptoren in inflammatorische (induzierbare) und homöostatische (konstitutive) Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren. **CXCR3** und **CCR5**, auf welche in dieser Arbeit näher eingegangen wird, rechnet man zu den inflammatorischen Chemokinrezeptoren (76). Neutrophile Granulozyten verändern unter chronischen Entzündungsprozessen ihre Rezeptorexpression. Anhand der oberflächlichen Chemokinrezeptoren lässt sich ihre Aktivierung charakterisieren.

## 1.2 Lungenerkrankungen im Kindesalter

### 1.2.1 Pneumonie

Eine Pneumonie beruht auf einer Entzündung der Lunge, die den Alveolarraum und/oder das Interstitium umfasst. Die Erkrankungsrate ist im 1. Lebensjahr besonders hoch und nimmt dann sukzessive ab. Neben bakteriellen Infektionen kommen auch Pilze, virale, allergische, chemische und physikalische Reize als Ursache in Frage. Das Alter bestimmt maßgeblich das bakterielle Erregerspektrum:

- Neugeborene (unter 4 Wochen): Enterobakterien, *Streptococcus B*, *Staphylococcus aureus*

- Säugling und junges Kleinkind (4 Wochen bis 5 Jahre): *Haemophilus influenzae*, Pneumokokken
- Schulalter (5 bis 18 Jahre): Pneumokokken, Mykoplasmen (56)

Die Pneumonie ist ein häufiges Krankheitsbild, das bei früher Diagnosestellung jedoch meist eine gute Prognose hat. Bislang existiert kein spezifischer Marker um Pneumonien im Kindesalter zu diagnostizieren.

### 1.2.2 Cystische Fibrose

CF ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der kaukasischen Rasse. Es kommt zu einer Funktionsstörung der exokrinen Drüsen, verursacht durch Mutationen im Gen des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), einem Chloridkanal. Zentrale Folge dieses Defektes ist eine pathologische, zähe Atemwegssekretion und eine chronisch persistierende Inflammationsreaktion der Lungen. (21)

Die chronische bakterielle Infektion der Atemwege mit einer Ansammlung von Neutrophilen Granulozyten und die resultierende Zerstörung des Lungengewebes ist hauptverantwortlich für die Mortalität und Morbidität bei CF (21). Besonders häufig sind die Infektionen durch *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosas* zu beobachten (92).

Hohe Spiegel von IL-8 und freier DNA zusammen mit einer Ansammlung von Neutrophilen Granulozyten sind, als Zeichen einer chronischen Entzündung, charakteristisch für die Lungenerkrankung von CF Patienten.

### 1.2.3 Asthma

Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Lunge (13). Von Asthma sind ca. 5% der Erwachsenen, Kinder jedoch mit 8-10% besonders häufig betroffen. Asthma ist die häufigste chronische Lungenerkrankung bei Kindern und ist in den letzten 30 Jahren in den westlichen Industrienationen zu der allgemein häufigsten chronischen Erkrankung im Kindesalter geworden (85). Asthma entwickelt sich meist zwischen dem vierten und fünften Lebensjahr. Man versteht darunter eine anfallsweise auftretende oder chronische Atemwegsobstruktion, die auf einer chronisch eosinophilen Entzündung der Atemwege beruht und von einer Hyperreagibilität des

Bronchialsystems begleitet wird. Die Obstruktion wird durch Spasmen der glatten Muskulatur, einer Schwellung der Bronchialschleimhaut und einer vermehrten Schleimproduktion verursacht (56). Die häufigsten Symptome sind intermittierende Hustenanfälle, pfeifende Atmung und Luftnot, ausgelöst durch Stress, Kälte oder Virusinfekte (80). Asthma gehört zu dem Formenkreis atopischer Erkrankungen (13) und es besteht häufig eine positive Familienanamnese für allergische Erkrankungen. Häufiger sind Kinder betroffen, die als Säuglinge schon von einer atopischen Dermatitis betroffen waren. Asthma ist eine chronische Erkrankung, wobei es durch den kontinuierlichen Umbau der Atemwege zu einer dauerhaften Schädigung der Lungenstruktur mit Emphysebildung und Verlust der Atemkapazität kommt (27).

## 2 Fragestellung

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautet:

„Welche Rolle spielen lösliche und zelluläre Abwehrmechanismen bei Lungenerkrankungen im Kindesalter?“

Mit Hilfe einer Aufteilung in folgende Einzelaspekte soll diese komplexe Frage beantwortet werden:

1. Welche Rolle spielen die löslichen Faktoren sCD14, SP-D, IL-8 und freie DNA bei Lungenerkrankungen im Kindesalter?
  - Finden sich bei Patienten mit Pneumonie, CF oder Asthma im Vergleich zur Kontrollgruppe veränderte Spiegel von sCD14, SP-D, IL-8 oder freier DNA in der BALF oder im Serum?
  - Eignen sich sCD14, SP-D, IL-8 oder freie DNA als potentielle neue Marker für Pneumonie, CF oder Asthma im Kindesalter?
2. Welche Rolle spielen die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 auf Neutrophilen Granulozyten bei Lungenerkrankungen im Kindesalter?

## 3 Material und Methoden

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Merck oder Sigma bezogen. Steriles Wasser (Aqua ad injectabilia) stammte von der Braun Melsungen AG und bovines Serum Albumin (BSA V) von der Firma Paesel+Lorei.

### 3.1 Enzyme linked Immunosorbent Assay

Unter enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) versteht man die quantitative Messung eines bestimmten Proteins in einem Medium mittels enzymgekoppelter Antikörper. Zunächst wird ein Stoffgemisch mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch das gesuchte Protein erkennt und an dieses bindet. Dieser primäre Antikörper wird anschließend von einem sekundären erkannt und gebunden, welcher wiederum mit einem Enzym gekoppelt ist. Nach Zugabe einer Farbreagenz wird diese durch das indirekt an die gesuchte Substanz gekoppelte Enzym verändert. Die Intensität der Farbreaktion ist somit von der Konzentration der gesuchten Substanz im Stoffgemisch abhängig.

#### 3.1.1 ELISA für SP-D

##### Material:

- Antikörper:

	Name/Art	Hersteller
<b>Einfangantikörper</b>	Anti Surfactant protein D; mouse; monoclonal	Antibodyshop, HYB246-08
	Anti Surfactant protein D; mouse; monoclonal	Antibodyshop, HYB245-02
<b>Primär Antikörper</b>	Anti human SP-D	Davids Biotechnologie, Regensburg
<b>Sekundär Antikörper</b>	Goat anti rabbit IgG HRP	Dianova, 111036045

- TMB-Lösung: HRP Substrate TMB (Tetramethylbenzidine) Solutions for ELISA (Uptima)

▪ Puffer:

Carbonatpuffer	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15mM
NaHCO <sub>3</sub>	35mM
In H <sub>2</sub> O pH 9,4	

Waschpuffer	
Tris/HCl	10mM
NaCl	140mM
CaCl <sub>2</sub>	5mM
Triton X-100	0,10%
In H <sub>2</sub> O pH 7,4	

Blockpuffer	
BSA	1%
In Waschpuffer	

Stopp-Lösung	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1M
In H <sub>2</sub> O	

- Mikrotiterplatten (Nunc, Maxisorp C96)
- ELISA- Washing unit (Behring)
- IPS Heizblock für Mikrotiterplatten (Sanofi)
- Anthos Ht III Mikrotiterplattenleser (Anthos Labtec Instruments, Typ 12600)

Methode:

**Beschichtung:** Die verwendeten NUNC Maxisorp Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit monoklonalen SP-D-Antikörpern (Einfangantikörper) beschichtet, die eine Kreuzreaktion mit humanem SP-D zeigten und von denen in einem 1:1 Gemisch 1 µg/ml in Carbonatpuffer gelöst war.

**Blocken:** Die Lösung und mit ihr der nicht gebundene Antikörper wurde dekantiert und verworfen. Um die Bindung unspezifischer Proteine an die Festphase zu verhindern, wurde sie mit 200 µl Blockpuffer pro Well für zwei Stunden bei 37 °C geblockt. Es folgten drei Waschvorgänge mit Waschpuffer.

**Inkubation mit Antigen:** Als Standard Antigen wurde SP-D in Verdünnungen von 27,78ng/ml bis 0,434ng/ml, in Blockpuffer gelöst (jeweils 100µl), aufgetragen. Es wurden zwei Standardreihen erstellt und damit der Messbereich des Assays festgelegt. Zwei Wells wurden für den Leerwert nur mit Blockpuffer gefüllt. Die Proben wurden 1:10

und 1:20 (Serum) bzw. 1:25, 1:50 und 1:100 (BALF) in Blockpuffer verdünnt und 100 µl davon eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Platten nochmals dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

*Inkubation mit 1. Antikörper:* Die Detektion des gebundenen SP-D erfolgte über eine Stunde bei 37°C mit SP-D Primär-Antikörper (100 µl Lösung pro Well, wobei der SP-D Primär-Antikörper 1:40.000 mit Blockpuffer verdünnt war). Erneut folgten drei Waschvorgänge mit Waschpuffer.

*Detektion des Intermediärkomplexes:* Daraufhin wurde mit SP-D Sekundär-Antikörper (1:10.00 in Blockpuffer verdünnt) eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert (jeweils 100 µl) und dann dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

*Substratreaktion:* Die Farbreaktion wurde mit 100 µl TMB-Lösung erzeugt und nach 5 Minuten mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt.

*Detektion:* Zur Quantifizierung der Färbung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Berechnung der Standardkurve aus den zwei Standardreihen und dem Leerwert sowie die davon abhängige Berechnung der Messwerte erfolgte mit der speziellen Biolise Software. Als optimaler Messbereich wurde derjenige Abschnitt auf der Standardkurve festgelegt, welcher ein mindestens doppeltes Signal des Leerwertes aufwies und in dem eine ausreichende Steigung vorlag.

### 3.1.2 ELISA für sCD14

#### Material:

- ELSIA für sCD14 (IBL, Hamburg, RE59271):
  - Mikrotiter Platte beschichtet mit anti-human-sCD14 Antikörper
  - sCD14 Antiserum
  - Enzymkonjugat
  - Standard sCD14 (0-112ng/ml)
  - Kontrolle
  - Verdünnungspuffer
  - Waschpuffer
  - TMB Substrat

- TMB Substrat Puffer
- TMB Stop Lösung
- Klebefolie
- ELISA- Washing unit (Behring)
- IPS Heizblock für Mikrotiterplatten (Sanofi)
- Anthos Ht III Mikrotiterplattenleser (Anthos Labtec Instruments, Typ 12600)

Methode:

Es wurde gemäß des mit gelieferten Protokolls verfahren. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Serumproben wurden 1:101 verdünnt, BALF-Proben wurden unverdünnt verwendet. 50µl Probe und 50µl sCD14 Antiserum (monoklonal) wurden jeweils pro Well einer mit anti-sCD14 Antikörper (oligoklonal) vorbeschichteten Mikrotiterplatte pipettiert und für zwei Stunden inkubiert. Die Platte wurde gewaschen und nach zufügen von 150µl Enzymkonjugat (Streptavidin konjugiert mit Peroxidase) für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 200µl TMB Substrat pro Well pipettiert. Die Substratreaktion wurde schließlich nach 20 min durch Zufügung von 100µl Stopplösung (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) angehalten und die Absorption bei 450nm mittels Photometer gemessen. Das untere Detektionslimit lag bei 7ng/ml.

### 3.1.3 ELISA für human IL-8

Material:

- ELISA für IL-8 (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, USA, DY208):
  - Capture Antibody (Part 890804)
  - Detection Antibody (Part 890805)
  - Standard (Part 890806) (2000pg/ml-31pg/ml)
  - Streptavidin-HRP (Part 890803)
- Puffer:

PBS Puffer	
NaCl	137mM
KCl	2,68mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,36mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76mM
In H <sub>2</sub> O pH 7,4	



Waschpuffer	
Tween 20	0,05%
In PBS-Puffer pH 7,4	

Verdünnungspuffer	
BSA	0,10%
Tween 20	0,05%
Trizma base	20mM
NaCl	150mM
In H <sub>2</sub> O pH 7,4	

Blockpuffer	
BSA	1%
NaN <sub>3</sub>	0,05%
In PBS-Puffer	

- Substrat: HRP Substrate TMB (Tetramethylbenzidine) Solutions for ELISA (Uptima)
- Stopplösung: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Mikrotiterplatten (Nunc, Maxisorp C96)
- ELISA- Washing unit (Behring)
- IPS Heizblock für Mikrotiterplatten (Sanofi)
- Anthos Ht III Mikrotiterplattenleser (Anthos Labtec Instruments, Typ 12600)

#### Methode:

Es wurde gemäß des mit gelieferten Protokolls verfahren. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Mikrotiterplatte wurde über Nacht mit 100µl pro Well einer auf 4µg/ml verdünnten anti IL- 8 Antikörperlösung inkubiert. Die Platte wurde gewaschen und mit 300µl eines BSA-haltigen Puffers für eine Stunde geblockt. Die Platte wurde erneut gewaschen, 100µl der jeweiligen Probe pro Well pipettiert und zwei Stunden inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Mikrotiterplatte für zwei Stunden mit 100µl einer 20µg/ml haltigen IL-8 Antikörperlösung inkubiert. Wieder wurde die Platte gewaschen und mit 100µl eines Enzymkonjugats (Streptavidin konjugiert mit Peroxidase) pro Well für 20 min inkubiert. Schließlich wurde ein letztes Mal gewaschen, für 20 min mit 100µl einer Substratlösung inkubiert und die Substratreaktion mit 50µl einer H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-haltigen Lösung gestoppt. Die Absorption wurde bei 450nm mittels Photometer gemessen. Das untere Detektionslimit lag bei 31,25 pg/ml.

## 3.2 Messung der freien DNA

### Material:

- SYBR Green I (invitrogen)
- Calf Thymus DNA (Sigma)
- Schwarze Fluoreszenzplatten (Nunc)
- Fluoreszenzmesser: Wallac Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer life sciences)
- Puffer:

TE Puffer	
Tris	10mM
EDTA	1mM
In H <sub>2</sub> O pH 8	

### Methode:

Es wurden 5µl DNA (in Puffer bzw. BAL) und 95µl TE-Puffer pro Well pipettiert. Die Standardreihe (5µg/ml-78,125ng/ml) wurde mit Calf Thymus Stammlösung (1mg/ml) und TE-Verdünnungspuffer hergestellt (TE-Puffer diente als Blank). In jedes Well wurden anschließend 100µl der Sybr Green Lösung (1:10.000 mit TE-Puffer verdünnt) gegeben und die Fluoreszenz gemessen. Die Auswertung der DNA Konzentration erfolgte mit Prism 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

## 3.3 Zellkultur

### 3.3.1 Isolierung von Neutrophilen Granulozyten

### Material:

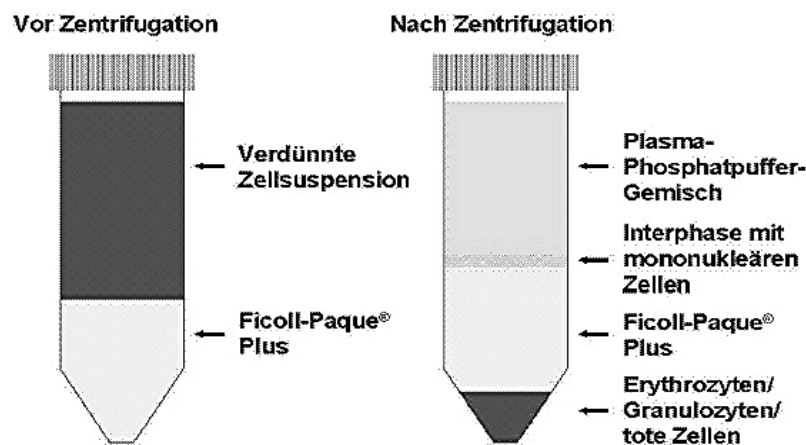
- Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB)
- Puffer:

PBS-Puffer	
NaCl	137mM
KCl	2,68mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,36mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76mM
In H <sub>2</sub> O pH 7,4	

Ammoniumchlorid-Puffer	
NH <sub>4</sub> Cl	4,15g
KHCO <sub>3</sub>	500mg
EDTA	18mg
In 500ml H <sub>2</sub> O	

#### Methode:

Verwendet wurde das Blut von gesunden Kontrollgruppen und mittels Dichtegradientenzentrifugation die Neutrophilen Granulozyten isoliert. Das Vollblut wurde 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt und diese Mischung vorsichtig auf das gleiche Volumen an Separationsmedium geschichtet. Anschließend wurde 20 Minuten bei 400g zentrifugiert.



**Abbildung 3-1 Schema zur Dichtegradientenzentrifugation**

Der Überstand über dem Pellet bestehend aus Erythrozyten und Granulozyten wurde abgenommen, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und 10 Minuten bei 4°C und 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit Ammoniumchlorid-Puffer resuspendiert und 30 Minuten zur Lyse der Erythrozyten inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand abgekippt und die Zellen erneut mit Ammoniumchlorid-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten inkubiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt und Verwerfen des Überstandes behielt man im Zellpellet die Neutrophilen Granulozyten.

### 3.3.2 Stimulation von Neutrophilen Granulozyten

Material:

- RPMI 1640 Medium + GlutaMAX I (invitrogen)
- 6 Well Platte Nunclon Surface (Nunc)
- Stimulantien:

Stimulanz	Abkürzung	Hersteller	Verwendete Konzentration
Flagellin	RecFLA-ST	invitrogen	300ng/ml
CpG (DNA)	ODN2216	invitrogen	5µM
Peptidoglycan ( <i>Staph.aureus</i> )	PGN-SA	invitrogen	10µg/ml
Bakterielles Lipoprotein	Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	invitrogen	10µg/ml
Zymosan	Zymosan	invitrogen	50µg/ml
Lipopolysaccharid	LPS	Sigma	10µg/ml
Interleukin-8	IL-8	Calbiochem	250ng/ml
Tumor Nekrose Faktor alpha	TNF $\alpha$	Calbiochem	100ng/ml
Interleukin-1 $\beta$	IL-1 $\beta$	Calbiochem	100ng/ml
Phorbol myristate acetate	PMA	Sigma-Aldrich	30ng/ml
Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine	fMLP	Sigma-Aldrich	1µM
Dexamethason	Dexamethason	Sigma	100nM

Methode:

Die isolierten Neutrophilen Granulozyten wurden in RPMI Nährmedium resuspendiert und jeweils 2ml pro Well in der Kulturplatte ausgesät.

Nach Zusatz der Stimulantien wurde 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Unter Zusatz von PMA und fMLP wurden die Zellen nur 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Alle Stimulationen wurden jeweils mit und ohne Dexamethason getestet.

### 3.4 Zelllyse

Material:

- Puffer:

PBS-Puffer	
NaCl	137mM
KCl	2,68mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,36mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76mM
In H <sub>2</sub> O pH 7,4	

Lysispuffer	
EDTA	20mM
Elugent	1%
In PBS-Puffer	

- Elugent (Calbiochem)
- Proteaseinhibitor: Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

#### Methode:

Das Nährmedium wurde abpipettiert und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 500µl Lysispuffer unter Zusatz von Proteaseinhibitor überschichtet und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß transferiert und 20 Minuten bei 12000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und der Zellschrott verworfen.

### 3.5 Quantitative Proteinbestimmung

#### Material:

- Bio-Rad Proteinassay Farbstoffreagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH)
- Mikrotiterplatten (Greiner, niedrigaffin, 96 Vertiefungen, transparent)
- Anthos Ht III Mikrotiterplattenleser (Anthos Labtec Instruments, Typ 12600)
- Puffer:

PBS-Puffer	
NaCl	137mM
KCl	2,68mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,36mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76mM
In H <sub>2</sub> O pH 7,4	

#### Methode:

Die Gesamtproteinkonzentration in den Proben wurde nach der Methode von Bradford bestimmt. Für den Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit abnehmenden Konzentrationen von BSA in PBS Puffer hergestellt: 5000 µg/ml, 2500µg/ml, 1250µg/ml, 625 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,3 µg/ml, 78,15 µg/ml. Es erfolgte eine Doppelbestimmung der einzelnen Standardkonzentrationen und der Proben mit jeweils 5 µl. Zum Anfärben der Proben und Standardlösungen wurden diese mit jeweils 100 µl des

Farbstoffreagenzes versetzt. Im Photometer wurde die Absorption bei 600 nm abzüglich des Leerwertes (Leerwert = Bio-Rad Reagenz + PBS) ermittelt und mit Hilfe der Standardreihe in Proteinkonzentrationen umgerechnet. Anschließend wurden die Proben aliquotiert und dabei auf 20 bzw. 100µg Gesamtprotein eingestellt.

### 3.6 Proteinpräzipitation

#### Methode:

Ziel der Proteinpräzipitation ist es die Proteine einer Probe auszufällen um sie so zu entsalzen. Mit einer Probe mit dem Volumen X wurde nach folgendem Schema vorgegangen, nach jedem Pipettierschritt wurde gevortext:

Probe	X ml
Methanol	4*X ml
Chloroform	1*X ml
H <sub>2</sub> O	3*X ml

Im Anschluss daran wurde zwei Minuten bei 14000g zentrifugiert. Die Oberphase wurde verworfen. Die Unterphase mit der Proteinschicht wurde wie folgt weiterbehandelt:

Methanol	3*X ml
----------	--------

Daraufhin wurde erneut 14000g zwei Minuten zentrifugiert, die Flüssigkeit dann vollständig verworfen und der Rückstand an der Luft trocknen gelassen.

### 3.7 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse

#### Material:

#### Elektrophorese:

- NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen)
- NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen)
- NuPAGE Reducing Agent (Invitrogen)
- NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Gel pH 6,4 (Invitrogen)

- NuPAGE Antioxidant (Invitrogen)
- MultiMark Multi-Colored Standard (Invitrogen)
- Xcell SureLock Minicell Kammer (Invitrogen)
- PowerEase 500 Power Supply (Invitrogen)
- Puffer:

Probenpuffer	
LDS Sample Buffer	25%
Reducing Agent	10%
H <sub>2</sub> O	65%

*Blot:*

- Xcell II Blot Module (Invitrogen)
- NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen)
- PVDF (polyvenylidene difluoride) Membran (Millipore)
- Puffer:

Transferpuffer	
NuPAGE Transfer Buffer	5%
Methanol	20%
H <sub>2</sub> O	75%

*Immunodetektion:*

- Puffer:

PBS-Puffer	
NaCl	137mM
KCl	2,68mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,36mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76mM
In H <sub>2</sub> O pH 7,4	

PBS-T-Puffer	
Tween 20	0,05%
In PBS-Puffer	

- Antikörper:

	Name/Art	Hersteller
Primär Antikörper	Anti human CCR5	R&D Systems, MAB181
	Anti human CXCR3	R&D Systems, MAB160
Sekundär Antikörper	Goat anti mouse IgG HRP	Chemicon international, 23070916

- ECL Chemilumineszenzlösung (Amersham)

- Entwicklungskassette (Amersham)
- Röntgenfilme (Amersham)
- Entwicklungsmaschine (AGFA CP 1000)

#### Methode:

Ein "Western blot" (syn: Immunoblot) ist eine Methode, um in einer Probe (z.B. Zelllysat) bestimmte Proteine mit jeweils spezifischen Antigenen nachzuweisen und der Molekülgröße nach aufzutrennen.

#### *Probenvorbereitung:*

Die Proben wurden je nach Proteingehalt in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert (bei 20µg Protein) oder präzipitiert (bei 100µg Protein) (siehe oben unter 3.6) und dann in jeweils 22 µl Probenpuffer aufgenommen. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren bei 1000g für 20 Sekunden wurden die Proben 10 Minuten lang im 70°C Wasserbad inkubiert. Nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

#### *Gelelektrophorese:*

Zu dem MES Laufpuffer wurde NuPAGE Antioxidant zugegeben um für stabile reduzierende Bedingungen zu sorgen. Als wide-range Indikator diente MultiMark 12. Die Elektrophorese erfolgte in den Mini Cell Kassetten unter folgenden Laufbedingungen: 200 V, Start: 100 mA, Ende: 60 mA, 40 min.

#### *Blotten:*

Nach der Elektrophorese erfolgte der Proteintransfer im vertikalen „SemiDry“ Verfahren unter Nutzung des Xcell II Blot Modules auf eine PVDF Membran für 60 Minuten bei 30V und 170 mA (Start) bzw. 110 mA (Ende) im NuPAGE Transfer Buffer.

#### *Immunodetektion:*

Die Membran wurde 3 Stunden in PBS Puffer mit 5% BSA inkubiert, um eine Absättigung der freien Bindungsstellen zu erreichen.

Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in PBS Puffer mit 1% BSA bei 4°C.

Nach Entfernen von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpern durch dreimaliges Waschen mit PBS-T Puffer jeweils 10 Minuten wurde mit dem 2. Antikörper (Meerrettichperoxidase konjugiert) in PBS-T Puffer mit 1% BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.



Die Membran wurde erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS-T gewaschen und schließlich nach Aktivierung mit der ECL Chemilumineszenzlösung auf Röntgenfilmen entwickelt.

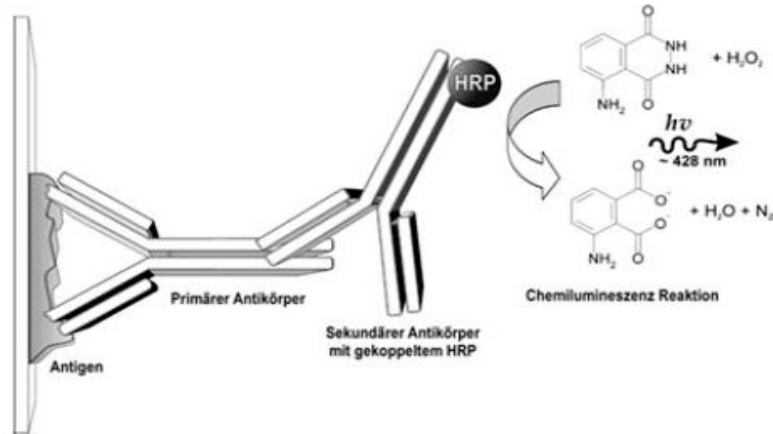


Abbildung 3-2 Prinzip der Chemilumineszenzreaktion

### 3.8 Mikroskopie

#### Material:

- Antikörper:

	Name/Art	Hersteller
Primär Antikörper	Anti human CCR5	R&D Systems, MAB181
	Anti human CXCR3	R&D Systems, MAB160
Sekundär Antikörper	Goat anti-mouse F(ab') <sub>2</sub> Alexa 555	Invitrogen, A21425

- Puffer:

Blockpuffer	
BSA	3%
FBS	10%
In PBS-Puffer	

- Concanavalin A Alexa 488 (Molecular Probes)
- Vectashield Hartset Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)
- Deckgläschen 15\*15mm (Menzel-Gläser)
- Objekträger 76\*26mm (Menzel-Gläser)
- 12-Well Platten (Costar)

- Nagellack
- Immunfluoreszenzmikroskop: Axiovert 135 (Zeiss), Kamera AxioCam MRm, Software AxioVision Rel. 4.5
- Konfokalmikroskop: Leica DM IRB (Leica), Leica TCS NT Laser System

#### Methode:

##### *Immunfluoreszenzmikroskopie:*

Bei der Immunfluoreszenzmikroskopie wird ein Objekt mit Licht einer bestimmten spektralen Verteilung beleuchtet. Das gesuchte Antigen wurde zuvor mit einem Fluorochrom gekoppelten Antikörper detektiert. Die fluoreszierenden Stoffe, werden durch das Licht zum Eigenleuchten angeregt und geben Licht mit bestimmten genau definierten Wellenlängen ab. Das abgestrahlte Licht (Fluoreszenzlicht) ist immer langwelliger als das Beleuchtungslicht. Um das sehr schwache Fluoreszenzlicht vom sehr viel stärkeren Beleuchtungslicht zu trennen, werden entsprechende Filter in den Beobachtungsstrahlengang gesetzt.

##### *Konfokalmikroskopie:*

Kombiniert man das Immunfluoreszenzmikroskop mit einem konfokalen Laserraster (Konfokales Laser-Rastermikroskop), so kann man Schichtbilder von dem untersuchten Objekt aufnehmen. Der Laserstrahl rastert dabei punktweise das Objekt und aus den gewonnenen Signalen kann Computer gestützt ein Schnittbild zusammengesetzt werden.

##### *Aussähen der Zellen:*

Um steril zu arbeiten wurden die Deckgläschen in Ethanol getaucht und abgeflammt. Es wurde anschließend jeweils ein Deckgläschen pro Well der Kulturplatte gelegt und mit den Neutrophilen Granulozyten in Nährmedium überschichtet. Bei der Stimulation der Zellen wurde wie unter 3.3.2 vorgegangen. Nach Ablauf der Inkubationszeit (bei 37°C) wurde die Kulturplatte für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert, um die Zellen am Deckgläschen locker haften zu lassen.

##### *Fixieren:*

Ab diesem Zeitpunkt wurde bei Raumtemperatur weitergearbeitet. Nach Abnehmen des Nährmediums wurden die Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 1ml einer 4%-igen Paraformaldehydlösung überschichtet. Nach 20 Minuten waren

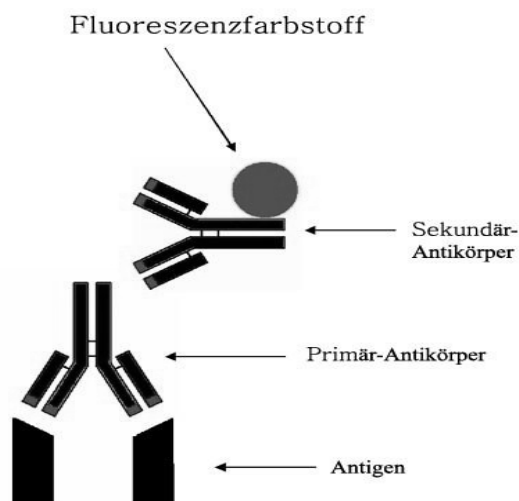
die Zellen auf dem Deckgläschen fixiert und die Paraformaldehydlösung konnte abpipettiert werden. Es folgten drei Waschschrte mit PBS-Puffer.

*Permeabilisieren:*

Je nachdem ob auch intrazelluläre Antigene detektiert werden sollten, wurden die fixierten Zellen für 10 Minuten in 1ml 0,5% Triton X-100 in PBS inkubiert. War der Fokus auf extrazelluläre Antigene gelegt, so wurde dieser Schritt übersprungen.

*Immunfärbung:*

Geblockt wurde mit 1ml Blockpuffer für 30 Minuten. Anschließend wurde für eine Stunde mit dem 1. Antikörper inkubiert (1:100 verdünnt mit Blockpuffer; 100µl). Es folgte ein dreimaliges Waschen für je 5 Minuten mit PBS-Puffer. Der 2. Antikörper wurde 1:200 mit Blockpuffer verdünnt und die Zellen für 30 Minuten, vor Licht geschützt, mit 100µl überschichtet. Erneut wurde gewaschen: dreimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser für je 5 Minuten (vor Licht geschützt). Die Deckgläschen wurden danach vorsichtig aus der Kulturplatte gehoben und luftblasenfrei mit der Vectashield-Lösung auf Objektträgern fixiert. Abschließend wurden die Präparate für 15 Minuten verdeckt trocknen gelassen und die Ränder der Deckgläschen mit Nagellack bestrichen, um sie vor dem Austrocknen zu bewahren. Bis zur Betrachtung unter dem Mikroskop wurden die Präparate im Dunklen bei 4°C aufbewahrt.



**Abbildung 3-3 Prinzip der Fluoreszenzdetektion**

### 3.9 Durchflusszytometrie

#### Material:

- Antikörper:

Name	Art	Hersteller
CCR5-phycoerythrin (PE)	mouse IgG2b	R&D Systems, Wiesbaden
CXCR3-fluorescein isothiocyanate (FITC)	mouse IgG1	R&D Systems, Wiesbaden
Isotyp-Kontrolle PE	mouse IgG2b	Becton&Dickinson, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle FITC	mouse IgG1	Becton&Dickinson, Heidelberg

- Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Auswertungsprogramm Cell Quest 3.1f (Becton Dickinson, Heidelberg)

#### Methode:

Für die Analyse der CCR5 und CXCR3 Expression auf Neutrophilen Granulozyten in der BAL wurde die Durchflusszytometrie oder FACS (fluorescence activated cell sorter) benutzt. Dabei passieren hintereinander angeordnete Zellen einen Laserstrahl. Der Strahl wird dabei abhängig von physikalischen Parametern der Zellen, wie Querschnittsfläche, Membranstruktur oder Granulationsgrad, unterschiedlich abgelenkt. Die entstehende unterschiedliche Streuung des Lichts nutzt man, um Größe und Granularität der Zellen zu messen. Dabei korreliert die Streuung des axial auf die Zellen treffenden Lichtstrahls mit der Zellgröße („Forward Angle Light Scatter“ – FSC) und die Streuung des orthogonal auf die Zellen treffenden Lichtstrahls mit der Zellgranularität („Side Angle Light Scatter“ – SSC). Nach Färbung der Zellen mit fluorochromgekoppelten Antikörpern ist es zusätzlich möglich, Oberflächenantigene zu markieren. Die Fluorochrome haben ein jeweils für sie charakteristisches Exzitations- und Emissionsspektrum. Sie werden mit einem Laserstrahl auf ihrer charakteristischen Exzitationswellenlänge angeregt. Die hierdurch entstehende Emission wird durch Photomultiplier detektiert. Die Auswertung erfolgt durch eine Auswertungssoftware, wobei der Prozentsatz der markierten Zellen bestimmt wird. Es wurden insgesamt über 10000 Zellen pro Probe analysiert. Die Expressionen wurden bestimmt, nachdem ein cut-off-Wert anhand der Isotypenkontrolle festgesetzt worden war.

### 3.10 Patienten und gesunde Kontrollgruppe

Die klinischen Parameter der Patienten und der Kontrollgruppe sind in folgender Tabelle aufgelistet:

	<b>Pneumonie</b>	<b>CF</b>	<b>Asthma</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>Anzahl</b>	48	39	15	8
<b>Alter (Jahre)</b>	4,4+/-3,4	11,4+/-3,9	7,1+/-4,1	6,4+/-4,2
<b>Geschlecht (M/F)</b>	28/20	23/16	7/8	5/3
<b>FEV1 (%)</b>	n.g.	95 +/- 20	68,2+/-12,2	n.g.
<b>FVC (%)</b>	n.g.	93 +/- 19	73,3+/-26,6	n.g.
<b>Neutrophile (%) in BAL</b>	22,3+/-26,6	47,5+/-35,3	15,7+/-22,7	2,3+/-1,2
<b>Makrophagen (%) in BAL</b>	59,4+/-24,6	47,1+/-33,4	74,1+/-21,2	87,4+/-9,0
<b>Lymphozyten (%) in BAL</b>	17,2+/-14,9	5,6+/-7,1	12,9+/-13,7	7,6+/-3,0

n.g. = nicht gemessen

**Tabelle 3-1 klinische Daten zu den untersuchten Patientengruppen**

#### 3.10.1 Pneumonie

Die Gruppe von Patienten mit Pneumonie bestand aus 48 Kindern im Alter von 0,3 bis 13,1 Jahren (Mittelwert 4,4), die verschiedene Grunderkrankungen hatten. Es wurden Kinder ausgewählt, die klinisch Symptome einer Pneumonie (Husten, Dyspnoe, Tachypnoe, Fieber), entsprechende Laborparameter (C-reaktives Protein, Leukozyten) und ein Infiltrat im Röntgenthorax und/oder in CT-Aufnahmen innerhalb von 2 Wochen vor der BAL aufwiesen. Eine BAL wurde zur weiteren diagnostischen Abklärung durchgeführt.

#### 3.10.2 Cystische Fibrose

Es wurden insgesamt 39 Patienten mit Mukoviszidose im Alter von 5,1 bis 18,8 Jahren (Mittelwert 11,4) untersucht. Die Diagnose wurde auf Grund der Anamnese, des klinischen Befundes sowie des positiven Schweißtestes und des Nachweises Mukoviszidose-spezifischer Genveränderungen verifiziert. Von den untersuchten Patienten waren 22 homozygote und 7 heterozygote Träger der  $\Delta F508$  Mutation. Die CF Patienten waren im Rahmen verschiedener klinischer Studien untersucht worden. Die Einsekundenkapazität (FEV1) betrug im Mittel 95%. Bei allen Patienten wurden in

der Bronchoskopie entzündliche Veränderungen unterschiedlichen Schweregrades gefunden.

### 3.10.3 Asthma

In die Asthma Gruppe wurden 15 Kinder zwischen 1 und 15,2 Jahren (Mittelwert 7,1) aufgenommen, die mit oder ohne Infektassoziation eine anfallsweise auftretende oder chronische Atemwegsobstruktion aufwiesen und bei denen Asthma bronchiale durch erhöhtes IgE, Prick-, und / oder RAST-Test bestätigt wurde. Lungenfunktionsuntersuchungen konnten nur bei Kindern über 5-6 Jahren durchgeführt werden. Alle Asthma Patienten verwendeten inhalative Bronchodilatoren und 9 Patienten zusätzlich inhalative Corticosteroide. Ihr FEV1-Wert lag im Mittel bei 68,2%, die forcierte Vitalkapazität bei 73,3%.

### 3.10.4 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe stellten 8 gesunde Kinder zwischen 3,7 und 15 Jahren (Mittelwert 6,4). Diese Kinder hatten keine Lungenerkrankungen und keine Allergien und wurden im Rahmen einer klinischen Studie untersucht (41).

## 3.11 Durchführung der bronchoalveolären Lavage

Die Bronchoskopie wurde in Anästhesie mittels eines flexiblen Bronchoskops mit einem Durchmesser von 3,5 mm (Kinder < 10 Jahre) bzw. von 4,9 mm (Kinder > 10 Jahre) durchgeführt. Das Bronchoskop wurde in ein Subsegment des Mittellappens, der Lingula oder an die betroffene Region der entsprechenden Lungenhälfte lumenverschießend (sogenannte „Wedge Position“) eingeführt. Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde mit 4 ml/kg Körpergewicht (jedoch maximal 50 ml) steriler Kochsalzlösung, auf Körpertemperatur vorgewärmt, in 4 Portionen á 1ml/kg durchgeführt. Die gewonnene BALF wurde durch eine Lage sterile Nitex-Gaze gefiltert. Die erste Fraktion wurde getrennt und die nachfolgenden Fraktionen wurden gepoolt weiterverarbeitet. Zellen und Zelldetritus wurden 10 Minuten lang bei 200g abzentrifugiert und der Überstand bei -80°C tiefgefroren.

### 3.12 Statistik

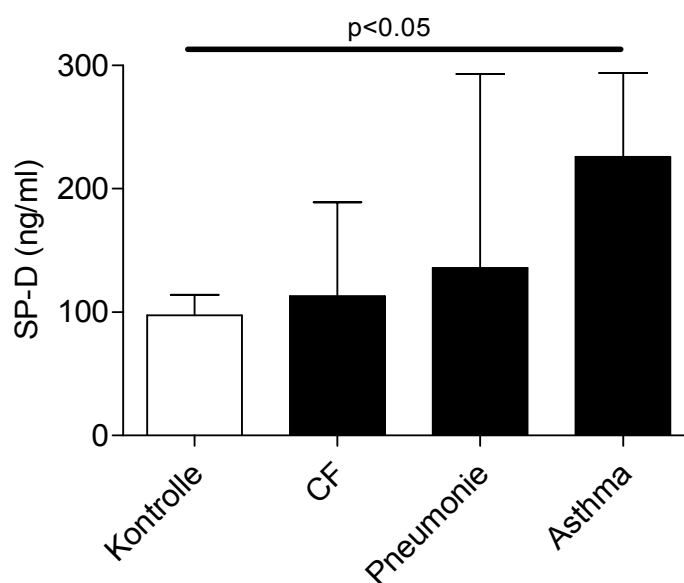
Da die erhobenen Daten nach Testung (*Kolmogorov-Smirnov-Test*) keine Normalverteilung zeigten, wurden Mediane und Interquartilabstände (IQRs) dargestellt. Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu ermitteln, wurde der non-parametrische Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, oder beim Vergleich mehr als zwei unabhängiger Stichproben der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet. Um Korrelationen stetiger Variablen zu berechnen, wurde der Spearman-Rho-Test angewandt. Eine signifikante Korrelation wurde angenommen, wenn der Korrelationskoeffizient  $r > 0,3$  und das Signifikanzniveau  $p < 0,05$  betrug.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Lösliche Faktoren

*Erläuterung zu den Diagrammen:* Auf der Abszisse sind die untersuchten Patientengruppen bzw. das untersuchte Medium aufgetragen, auf der Ordinate der jeweilige Parameter. Es sind Mediane und Interquartilabstände dargestellt.

#### 4.1.1 SP-D



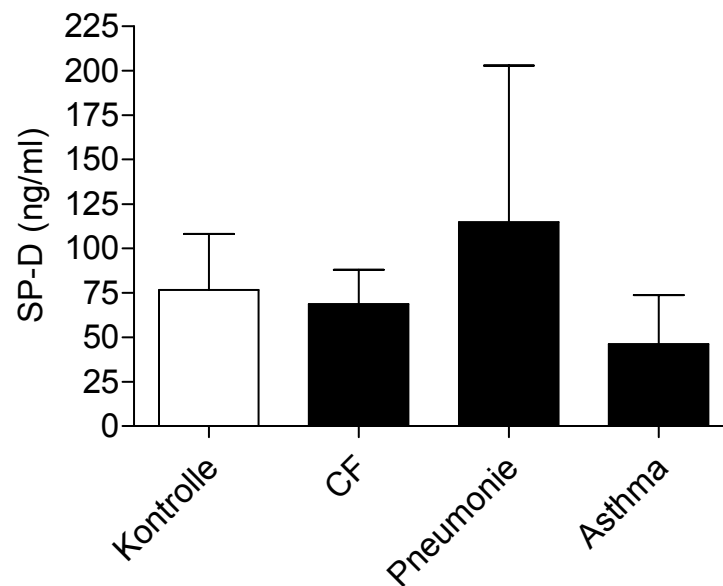
**Abbildung 4-1 SP-D Konzentrationen in der BALF**

Abbildung 4-1 zeigt SP-D Spiegel in der BAL von Kindern mit CF, Pneumonie, Asthma und Kontrollgruppe. Kinder mit Asthma hatten signifikant höhere SP-D Spiegel in der BAL im Vergleich zu Kontrollprobanden ( $p<0,05$ ). Die Spiegel der Pneumonie Kinder waren tendenziell höher als bei der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant.

Patienten	Kontrollen	CF	Pneumonie	Asthma
Mittelwert	97,38	149,6	209,6	225,8
Median	95,00	113,2	135,9	219,0
Standardabweichung	20,09	135,1	229,1	122,8
Minimum	75,00	0,0	13,80	18,40
Maximum	135,0	598,5	1132	398,0

**Tabelle 4-1 SP-D Spiegel in der BALF (angegeben in ng/ml)**





**Abbildung 4-2 SP-D Konzentrationen im Serum**

Keine der Patientengruppen zeigte eine signifikante Abweichung der SP-D Serum Spiegel von der Kontrollgruppe. Es fand sich jedoch eine Tendenz zu erhöhten SP-D Spiegeln bei Kindern mit Pneumonie im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4-2).

Patienten	Kontrollen	CF	Pneumonie	Asthma
<b>Mittelwert</b>	76,67	68,77	133,3	46,29
<b>Median</b>	68,15	49,60	114,9	44,50
<b>Standardabweichung</b>	37,64	57,57	86,25	38,38
<b>Minimum</b>	37,69	2,200	3,000	4,900
<b>Maximum</b>	141,1	215,0	305,0	133,4

**Tabelle 4-2 SP-D Spiegel im Serum (angegeben in ng/ml)**

## 4.1.2 sCD14

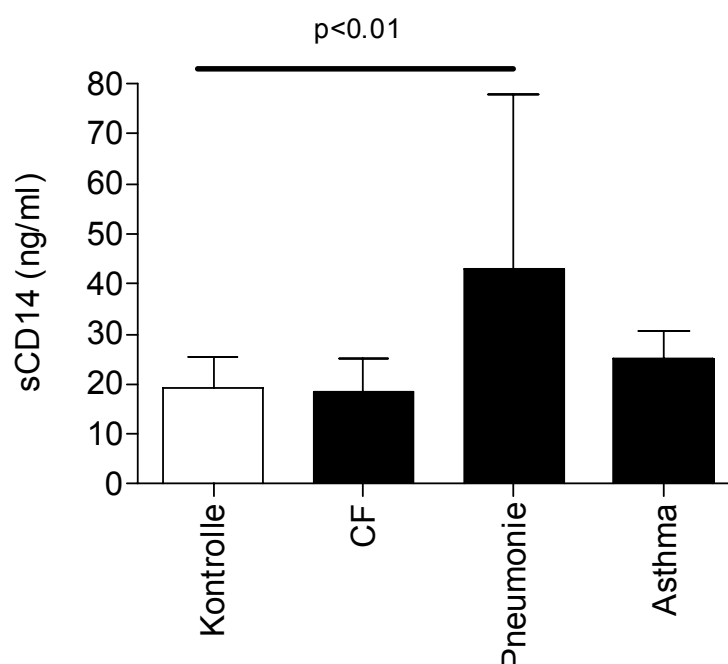
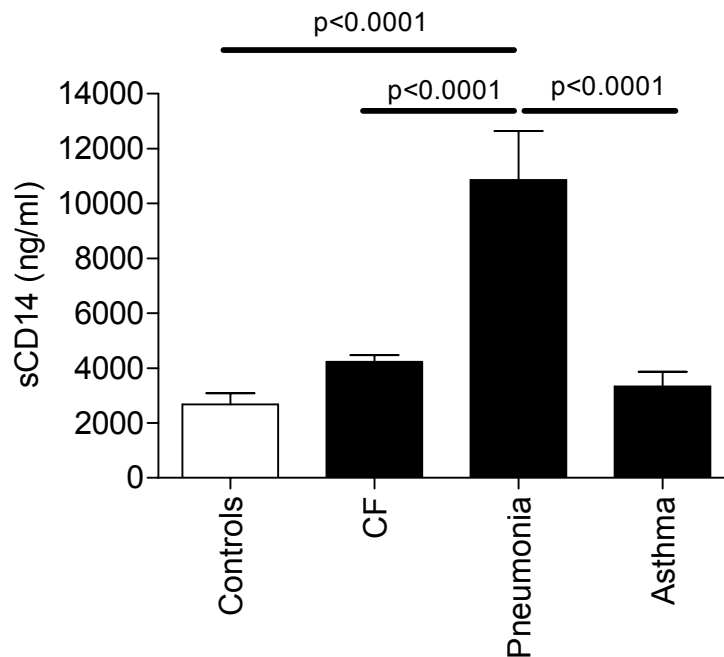


Abbildung 4-3 sCD14 Konzentrationen in der BALF

Abbildung 4-3 zeigt sCD14 Spiegel in der BAL von Kindern mit CF, Pneumonie und Asthma, sowie von der Kontrollgruppe. Kinder mit Pneumonie hatten signifikant höhere sCD14 Spiegel in der BAL im Vergleich zu Kontrollprobanden ( $p < 0,01$ ). Die Spiegel der Kinder mit CF und Asthma unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe.

Patienten	Kontrollen	CF	Pneumonie	Asthma
Mittelwert	19,14	16,52	58,54	25,12
Median	18,95	13,20	42,90	25,00
Standardabweichung	18,32	10,71	50,09	8,815
Minimum	6,800	6,300	7,600	12,00
Maximum	32	44,00	198,0	45,20

Tabelle 4-3 sCD14 Spiegel in der BALF (angegeben in ng/ml)



**Abbildung 4-4 sCD14 Konzentrationen im Serum**

Unsere Messungen ergaben, wie in Abbildung 4-4 dargestellt, dass im Serum die sCD14 Konzentrationen in der Pneumonie Gruppe signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht waren ( $p < 0,0001$ ). Auch im Vergleich zu der CF- und Asthmagruppe waren die sCD14 Spiegel bei Pneumonie signifikant höher ( $p < 0,0001$ ). Die Spiegel im Serum von CF und Asthma unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

Patienten	Kontrollen	CF	Pneumonie	Asthma
Mittelwert	2678	4230	10710	3328
Median	2654	4229	10858	2960
Standardabweichung	984,1	770,8	2834	1222
Minimum	2154	2437	5429	2134
Maximum	3764	6061	15460	5588

**Tabelle 4-4 sCD14 Spiegel im Serum (angegeben in ng/ml)**

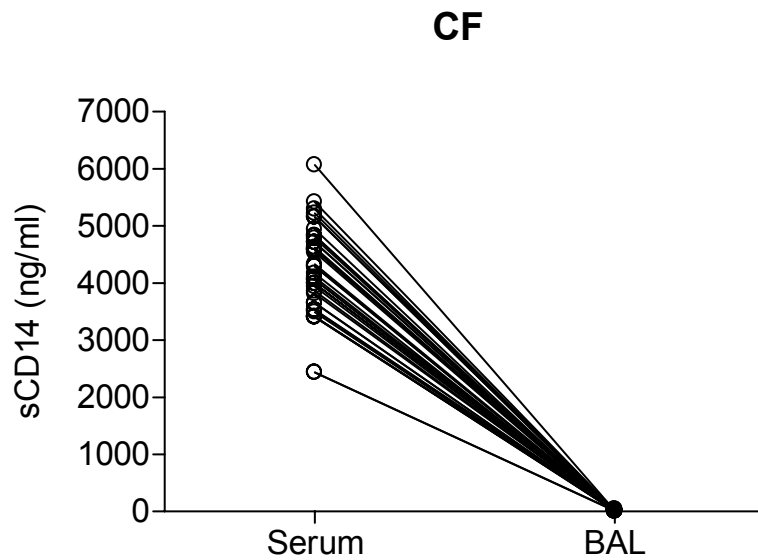


Abbildung 4-5 sCD14 Konzentration im Serum und in der BALF bei CF

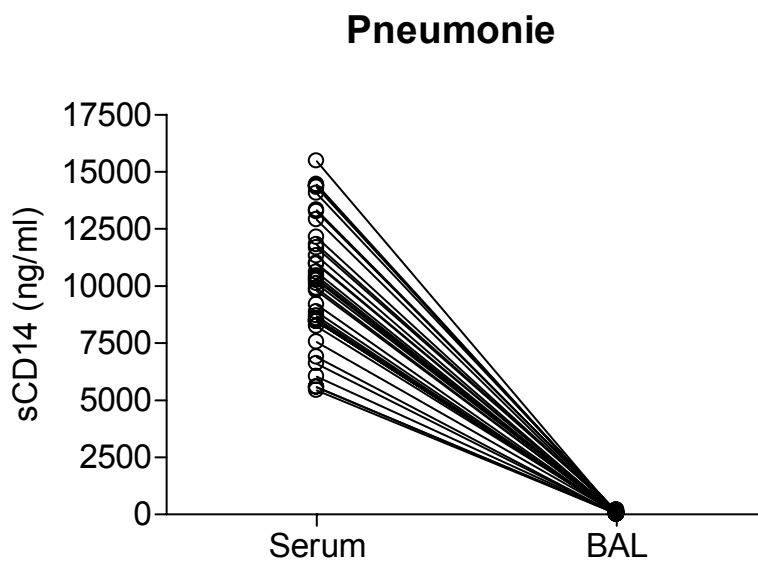
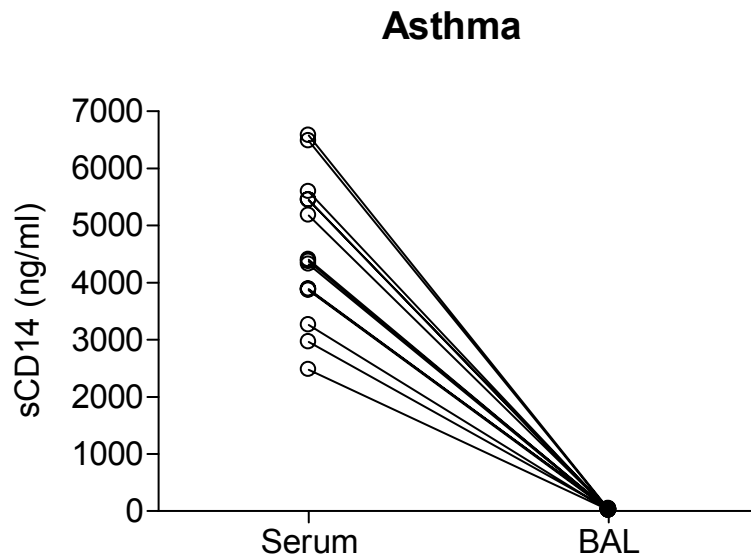
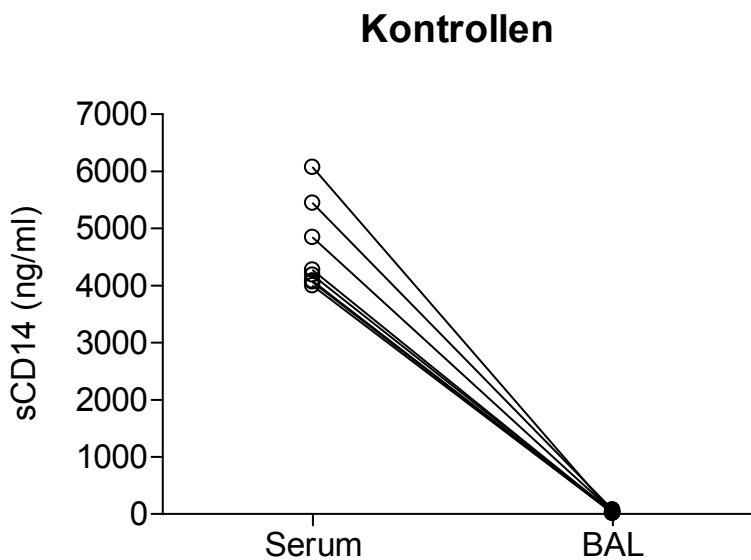


Abbildung 4-6 sCD14 Konzentration im Serum und in der BALF bei Pneumonie

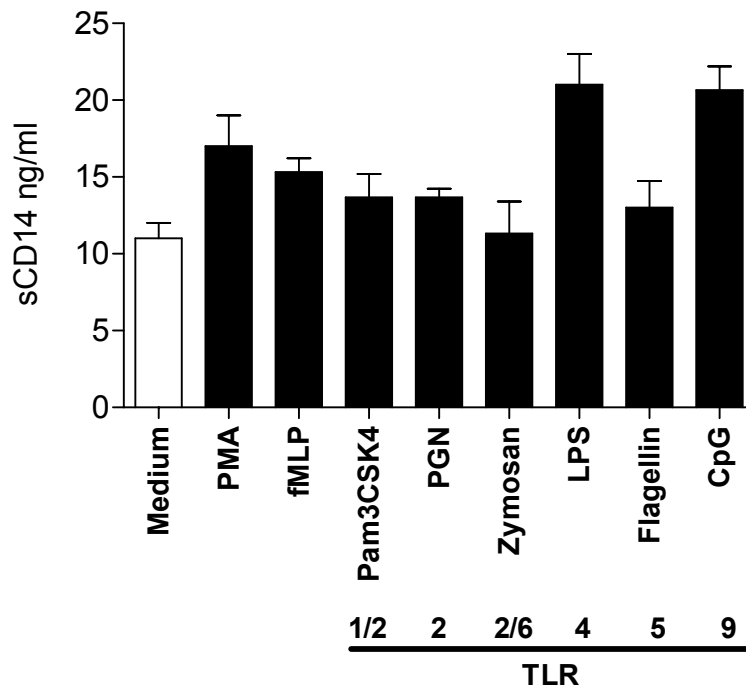


**Abbildung 4-7 sCD14 Konzentration im Serum und in der BALF bei Asthma**



**Abbildung 4-8 sCD14 Konzentration im Serum und in der BALF bei den Kontrollpatienten**

In allen Gruppen waren die sCD14 Konzentrationen im Serum höher als in der BALF (Abb. 4-5 bis 4-8). Die Konzentrationen in der BALF bewegten sich im zweistelligen, im Serum im vier- bis fünfstelligen Nanogrammbereich pro Milliliter.



**Abbildung 4-9 sCD14 Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Stimulation von Neutrophilen Granulozyten mit bakteriellen Liganden für 40 Stunden bei 37°C**

Die Abbildung 4-9 stellt die Messungen von sCD14 Konzentrationen im Zellkulturüberstand von Neutrophilen Granulozyten mit und ohne Stimulation dar. Die Zellen wurden mit bakteriellen Liganden stimuliert und für 40 Stunden bei 37°C inkubiert. Es zeigte sich, dass die Konzentrationen von sCD14 bei allen Stimulantien anstieg, jedoch unterschiedlich stark. LPS (TLR4) und CpG (TLR9) hatten den stärksten Effekt auf die sCD14 Freisetzung. Die Konzentration von sCD14 im Kulturüberstand nach Stimulation mit diesen beiden TLR-Liganden war doppelt so hoch wie nach Inkubation in reinem Nährmedium. Als schwächer erwiesen sich die Effekte bei Zugabe von PMA, fMLP, PGN (TRL2), Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (TRL1/2) und Flagellin (TRL5). Nach Stimulation mit Zymosan (TRL2/6) konnte im Zellkulturüberstand gegenüber dem Überstand der unstimulierten Zellen nur ein sehr schwacher Anstieg der sCD14 Konzentration festgestellt werden.

## 4.1.3 IL-8

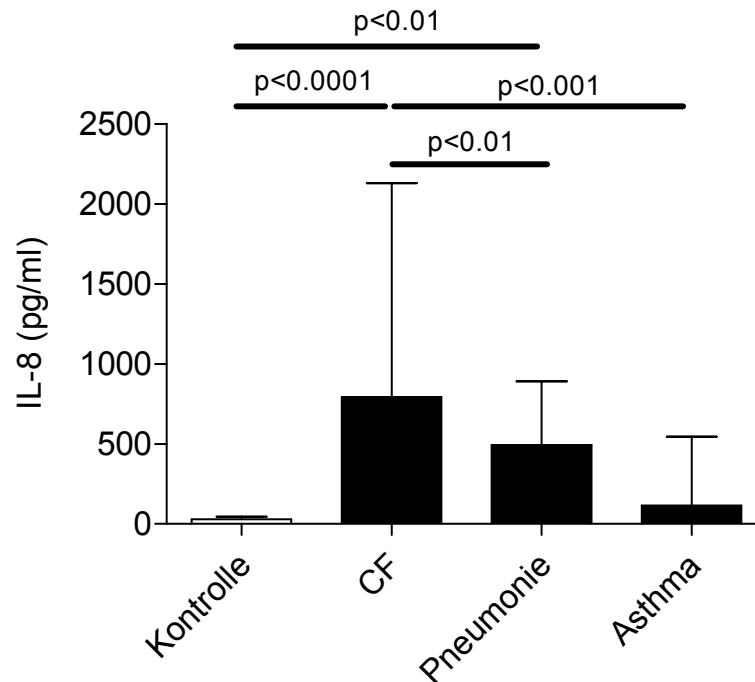
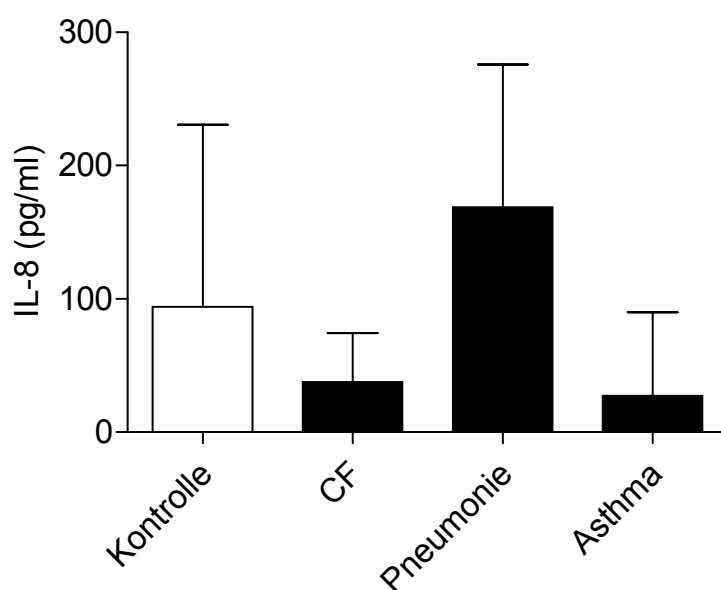


Abbildung 4-10 IL-8 Konzentrationen in der BALF

In der Abbildung 4-10 sind die IL-8 Konzentrationen in der BALF dargestellt. Die Konzentration war bei der CF Gruppe am höchsten und unterschied sich signifikant von allen anderen Gruppen: Kontrolle ( $p<0,0001$ ), Asthma ( $p<0,001$ ) und Pneumonie ( $p<0,01$ ). Auch bei der Pneumoniegruppe waren die Spiegel signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p<0,01$ ). Die Asthmagruppe unterschied sich in ihren IL-8 Spiegeln nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

Patienten	Kontrollen	CF	Pneumonie	Asthma
Mittelwert	28,81	1304	492,4	484,5
Median	16,50	792,9	97,00	115,0
Standardabweichung	34,84	1363	1195	758,2
Minimum	0,0	40,00	0,0	0,0
Maximum	110,9	7013	6177	2576

Tabelle 4-5 IL-8 Spiegel in der BALF (angegeben in pg/ml)



**Abbildung 4-11 IL-8 Konzentrationen im Serum**

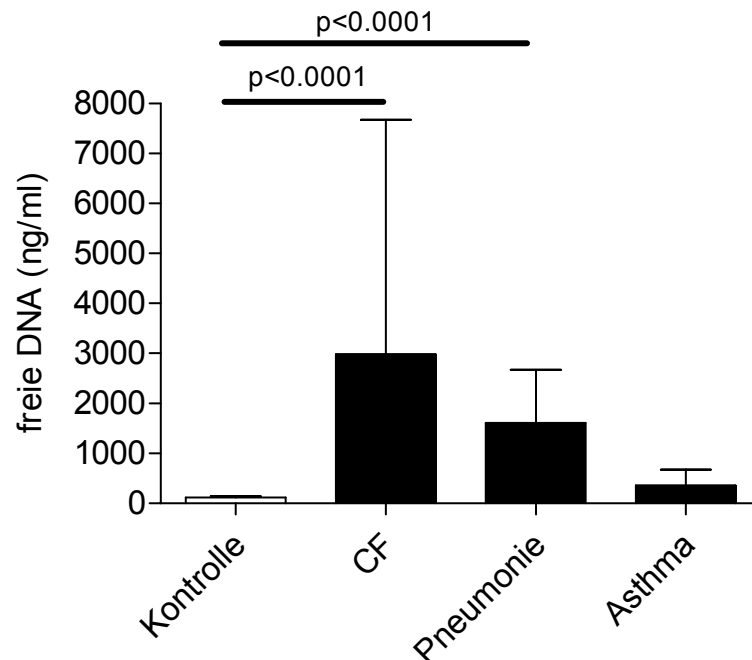
Wir konnten keine klare Tendenz der IL-8 Konzentrationen im Serum finden (Abb. 4-11). Die IL-8 Konzentrationen waren bei CF und Asthma tendenziell niedriger als in der Kontrollgruppe, bei Pneumonie etwas erhöht.

Patienten	Kontrollen	CF	Pneumonie	Asthma
Mittelwert	145,2	47,36	168,6	27,32
Median	94,20	37,65	157,3	0,0
Standardabweichung	136,4	36,83	107,4	62,54
Minimum	55,60	0,0	31,70	0,0
Maximum	490,0	142,1	486,2	183,2

**Tabelle 4-6 IL-8 Spiegel im Serum (angegeben in pg/ml)**



#### 4.1.4 freie DNA



**Abbildung 4-12 Konzentration der freien DNA in der BALF**

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen von freier DNA in der BALF sind in der Abbildung 4-12 zusammengefasst. Sowohl in der BALF von CF, als auch von Pneumonie Patienten war die Konzentration von freier DNA im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $p < 0,0001$ ). Dabei zeigten höhere Werte bei CF, als bei Pneumonie. Bei Asthma fanden wir tendenziell erhöhte Spiegel, die sich jedoch als nicht signifikant erwiesen.

Patienten	Kontrollen	CF	Pneumonie	Asthma
Mittelwert	114,7	4505	1608	362,3
Median	114,6	2989	315,6	134,4
Standardabweichung	37,62	4800	3554	472,7
Minimum	53,80	120,1	2,600	10,00
Maximum	182,2	24140	15383	1301

**Tabelle 4-7 freie DNA Spiegel in der BALF (angegeben in ng/ml)**

## 4.1.5 Korrelationen

### 4.1.5.1 freie DNA zu SP-D

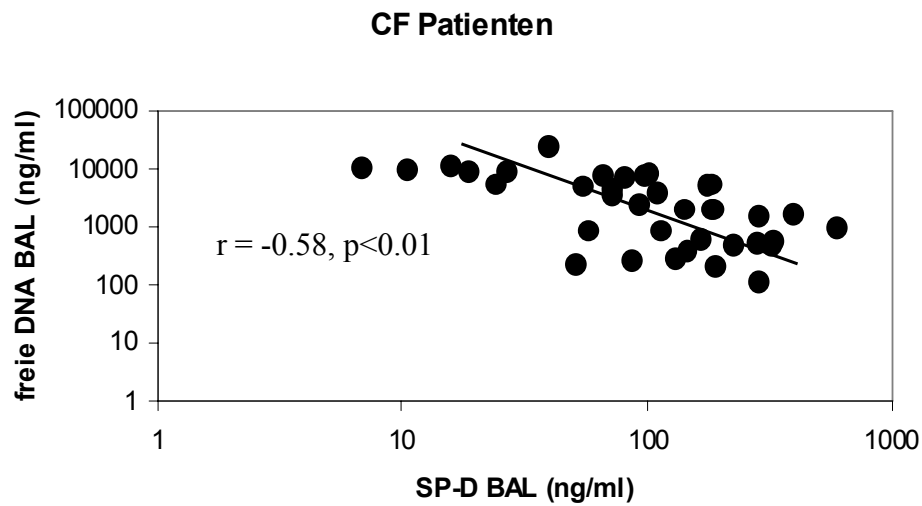


Abbildung 4-13 Korrelation der freien DNA zu SP-D in der BALF von CF Patienten

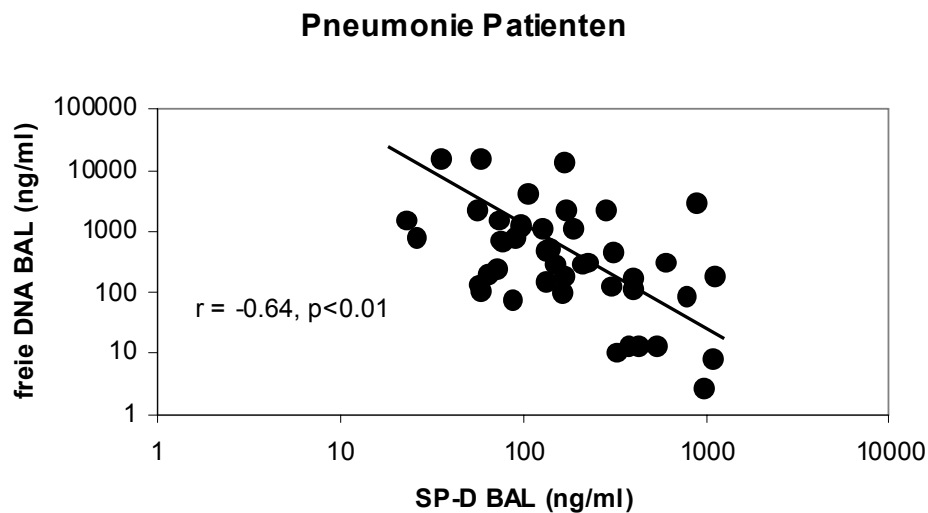
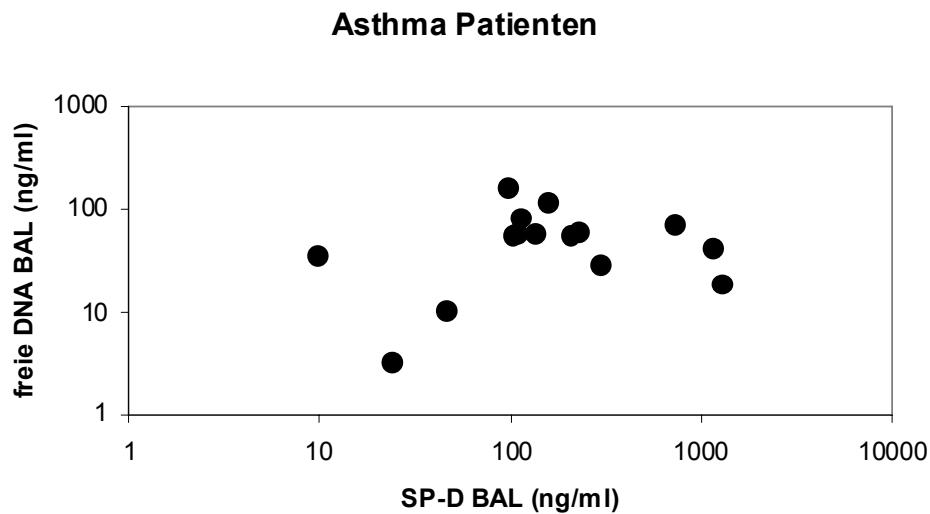
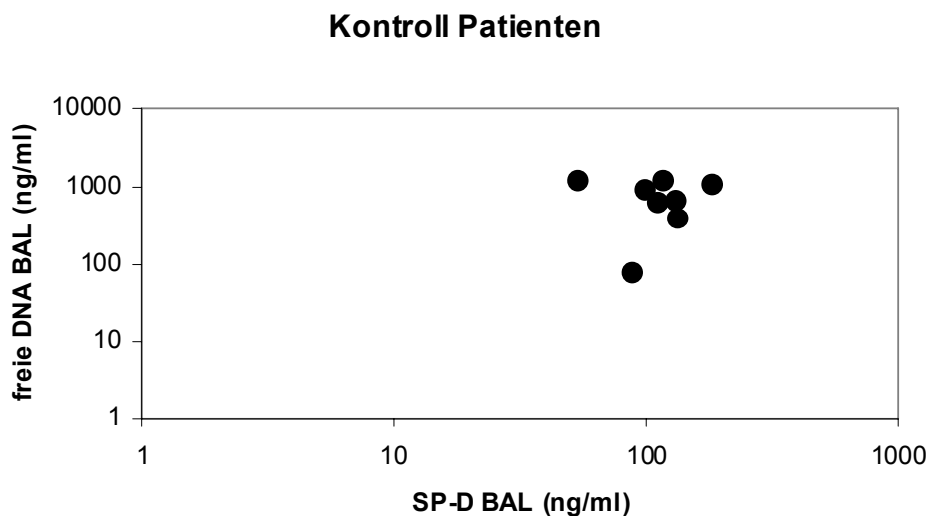


Abbildung 4-14 Korrelation der freien DNA zu SP-D in der BALF von Pneumonie Patienten



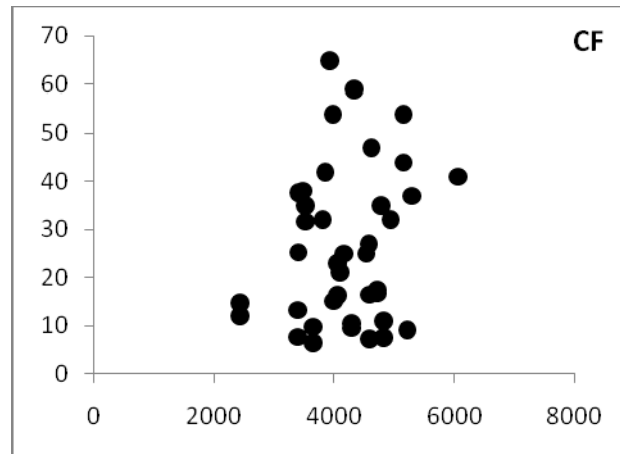
**Abbildung 4-15** Korrelation der freien DNA zu SP-D in der BALF von Asthma Patienten



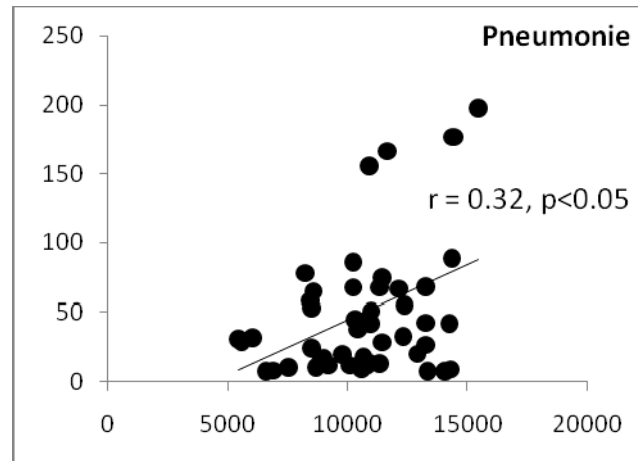
**Abbildung 4-16** Korrelation der freien DNA zu SP-D in der BALF von Kontrollpatienten

Die Abbildungen 4-13 und 4-14 zeigen, dass die Konzentration der freien DNA in der BALF mit der Konzentration von SP-D in der BALF bei CF ( $r=-0,58$ ) und Pneumonie ( $r=-0,64$ ) signifikant negativ korreliert ( $p<0,01$ ). Die Korrelationen bei den Asthma- und Kontrollpatienten waren nicht signifikant (Abb. 4-15 und 4-16).

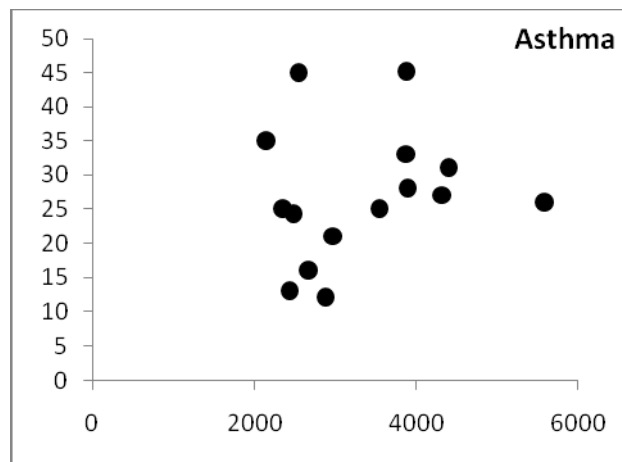
#### 4.1.5.2 sCD14 in BALF zu Serum



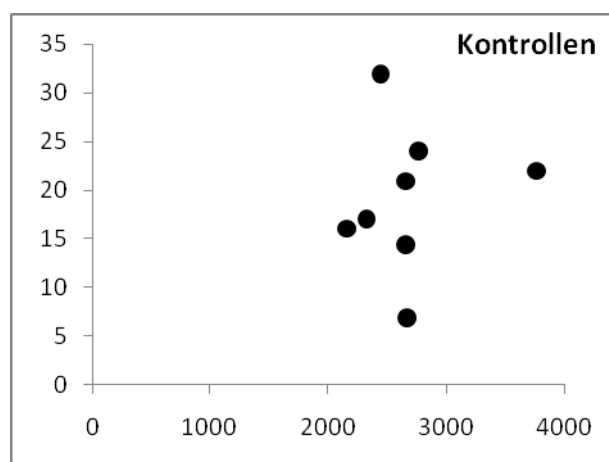
**Abbildung 4-17 Korrelation der sCD14 Spiegel in der BALF zu sCD14 Spiegel in im Serum bei CF Patienten**



**Abbildung 4-18 Korrelation der sCD14 Spiegel in der BALF zu sCD14 Spiegel in im Serum bei Pneumonie Patienten**



**Abbildung 4-19 Korrelation der sCD14 Spiegel in der BALF zu sCD14 Spiegeln im Serum bei Asthma Patienten**

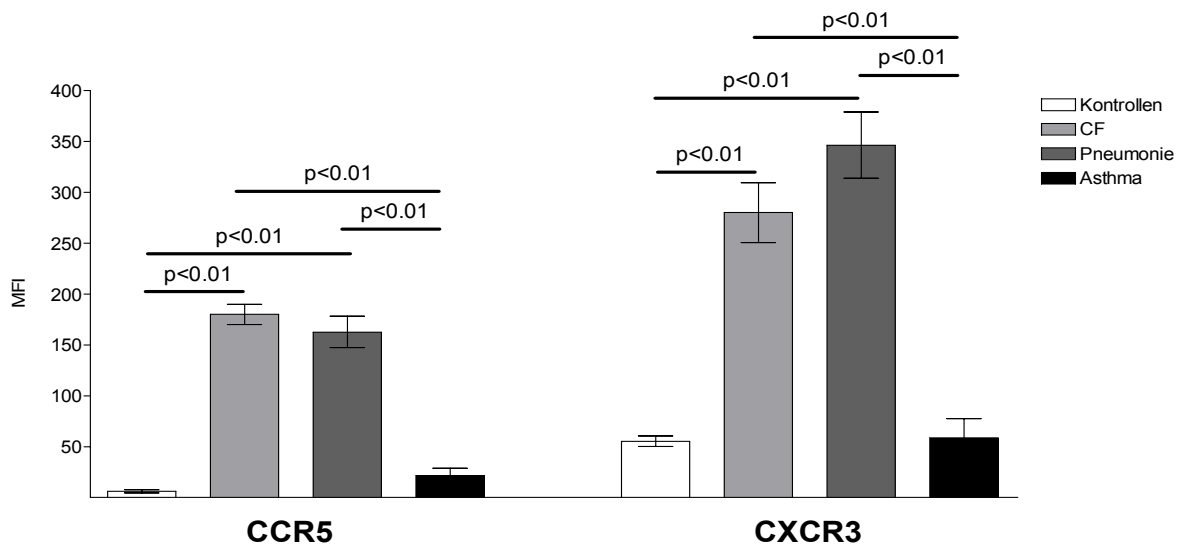


**Abbildung 4-20 Korrelation der sCD14 Spiegel in der BALF zu sCD14 Spiegeln im Serum bei Kontrollpatienten**

Die Untersuchung ergab, dass die Konzentration von sCD14 in der BALF mit den Konzentrationen von sCD14 im Serum bei Pneumonie signifikant positiv korrelierten (Abb. 4-18).

## 4.2 Zelluläre Faktoren

### 4.2.1 Durchflusszytometrie Ergebnisse



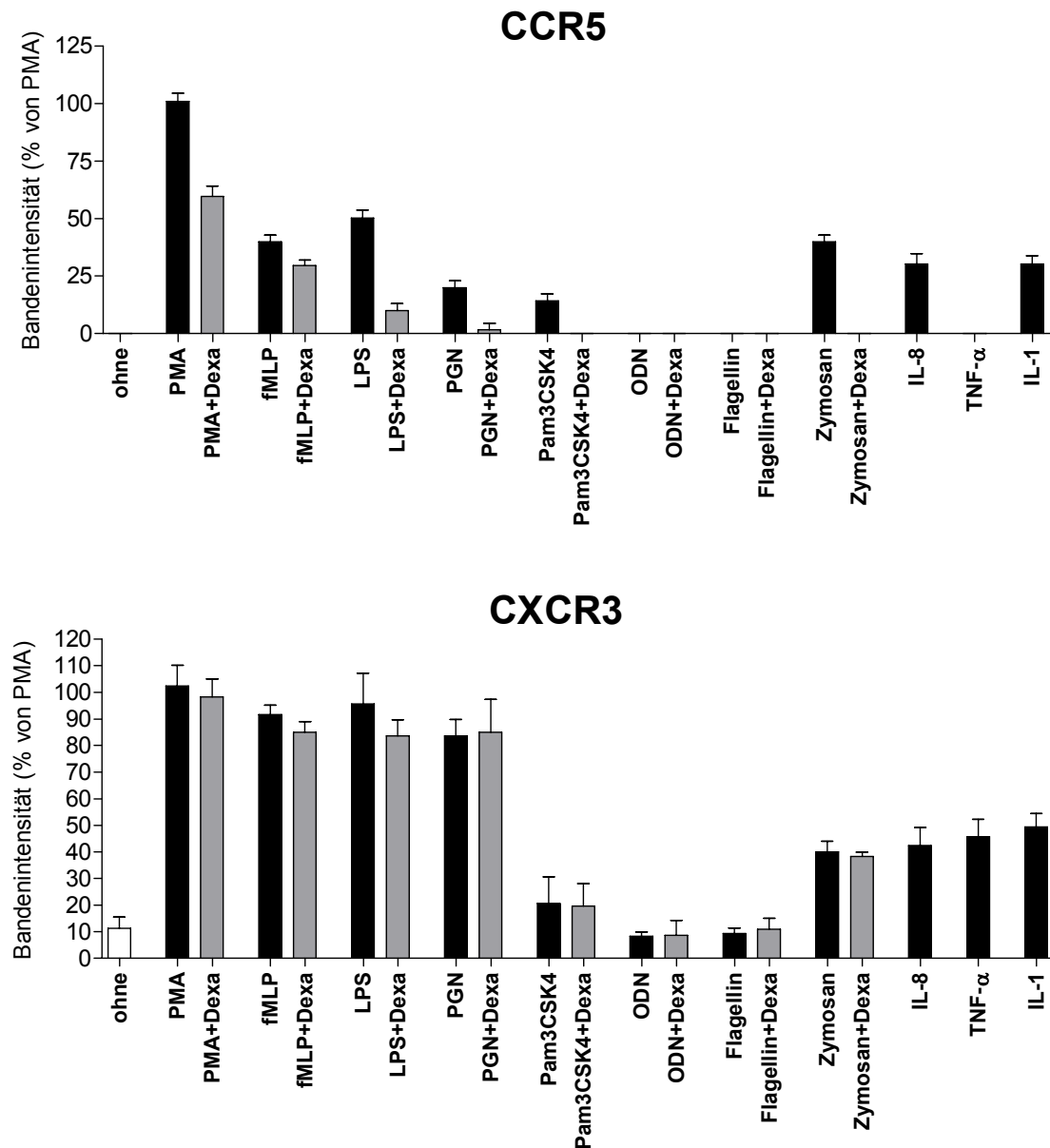
**Abbildung 4-21 CCR5 und CXCR3 Expression auf der Oberfläche von Neutrophilen Granulozyten aus BAL von Patienten mit CF, Pneumonie oder Asthma bzw. von Kontrollen, dargestellt in MFI (mittlere Fluoreszenzintensität).**

Mittels Durchflusszytometrie untersuchten wir die CCR5 und CXCR3 Expression auf der Oberfläche von Neutrophilen Granulozyten aus BALF von Patienten mit CF, Pneumonie und Asthma, sowie von gesunden Kontrollen (Abb. 4-21). CXCR3 war in allen Gruppen stärker auf der Oberfläche von Neutrophilen Granulozyten exprimiert als CCR5.

CCR5 war am stärksten bei CF und Pneumonie exprimiert (bei CF höher als bei Pneumonie). Die Expression unterschied sich jeweils signifikant von der CCR5 Expression bei der Kontroll- und Asthmagruppe (jeweils  $p < 0,01$ ). Die Expression bei den Zellen der Asthmagruppe war leicht, jedoch nicht signifikant, erhöht gegenüber der Kontrollgruppe.

Auch CXCR3 war bei CF und Pneumonie am stärksten, wobei hier die Expression bei Pneumonie höher war, als bei CF. Ebenso wie bei CCR5, unterschied sich die Expression von CXCR3 bei CF und Pneumonie jeweils signifikant von der CXCR3 Expression bei der Kontroll- und Asthmagruppe (jeweils  $p < 0,01$ ). Die Asthma- und Kontrollgruppe wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

## 4.2.2 Western Blot Ergebnisse



**Abbildung 4-22** Darstellung der Bandenintensität nach CCR5 und CXCR3 Detektion im Zelllysat von stimulierten und unstimulierten Neutrophilen Granulozyten durch Western Blot. Die Balken spiegeln die Bandenintensität in % der Maximalintensität nach PMA Stimulation wider.

CCR5, welcher auf unstimulierten Neutrophilen Granulozyten nicht nachweisbar war (0%), wurde nach PMA Stimulation maximal erhöht (100%). LPS (50%) stellte vor fMLP (40%) und Zymosan (40%), den nächst stärkeren Reiz dar. IL-8 (30%), IL-1 $\beta$  (30%) und schließlich PGN (20%) und Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (15%) wirkten schwächer. Bei Stimulation mit ODN, Flagellin und TNF $\alpha$  konnte kein Effekt gezeigt werden (0%).

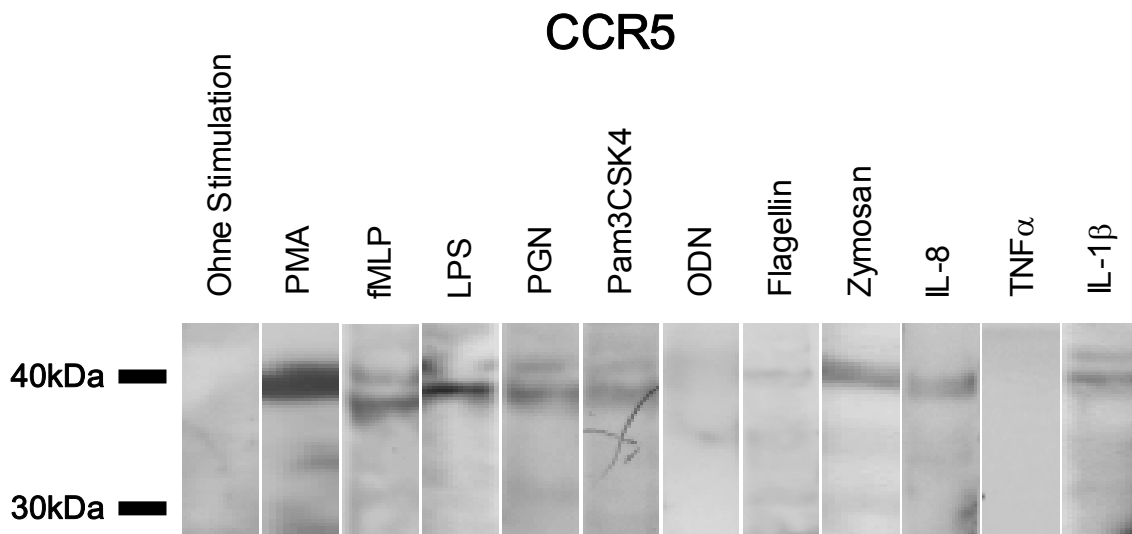
Es zeigte sich weiterhin, dass die Zugabe von Dexamethason zu den einzelnen Stimulationen einen dämpfenden Effekt hatte. Die Bandenintensität wurde bei PMA (60%), fMLP (30%), LPS (10%) und PGN (5%) schwächer. Bei Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, ODN, Flagellin und Zymosan war CCR5 nach Dexamethason Zugabe nicht mehr nachweisbar (0%).

CXCR3 war bei unstimulierten Zellen sehr schwach nachweisbar (10%) und wurde durch PMA maximal erhöht (100%). LPS (95%), fMLP (90%) und PGN (85%) stellten ebenfalls sehr starke Reize dar. IL-1 $\beta$  (55%), TNF $\alpha$  (50%), IL-8 (45%) und Zymosan (42%) wirkten schwächer und Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (20%) nur sehr leicht. Keinen Effekt hatten ODN und Flagellin (10%).

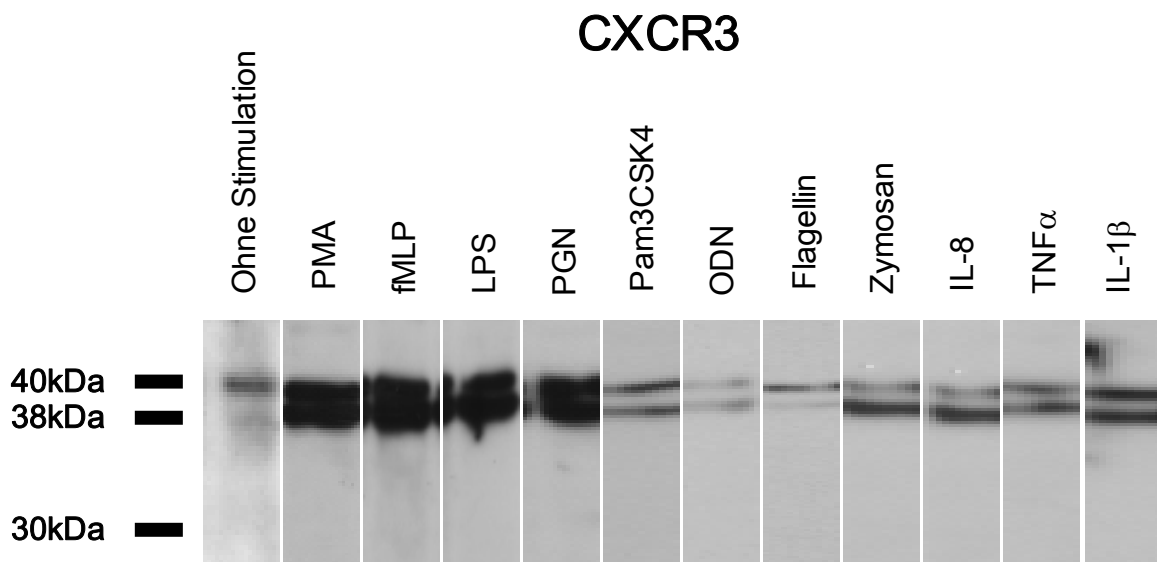
Die dämpfende Wirkung von Dexamethason auf CXCR3 war schwächer ausgeprägt als bei CCR5, aber vorhanden.

Ein leichter Abfall der Bandenintensität zeigte sich bei PMA (98%), fMLP (85%), LPS (85%) und Zymosan (38%). PGN (85%), Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (20%) und ODN (10%) blieben gleich. Bei Flagellin zeigte sich eine leichte Steigerung der Bandenintensität durch Zugabe von Dexamethason (12%).





**Abbildung 4-23** Western Blot Banden nach CCR5 Detektion im Zelllysate von stimulierten und unstimulierten Neutrophilen Granulozyten. CCR5 ist ca. 40kDa groß.

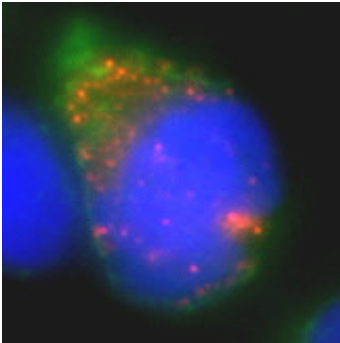


**Abbildung 4-24** Western Blot Banden nach CXCR3 Detektion im Zelllysate von stimulierten und unstimulierten Neutrophilen Granulozyten. CXCR3 ist ca. 40kDa groß die kleinere Isoform ca. 38kDa.

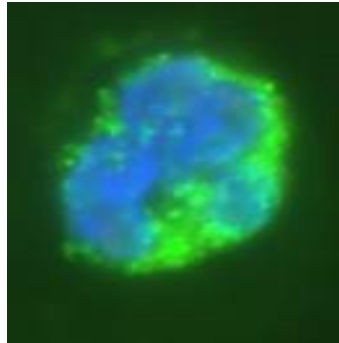
### 4.2.3 Mikroskopie Ergebnisse

#### Ohne Stimulation

CXCR3

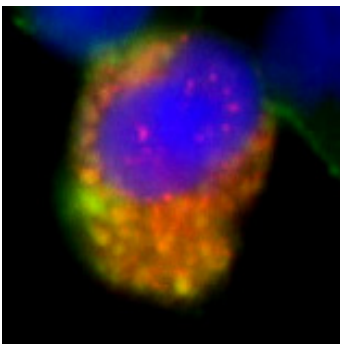


CCR5

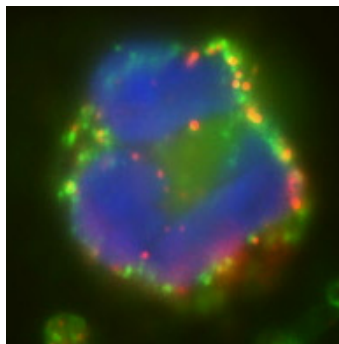


#### Nach Stimulation mit fMLP

CXCR3



CCR5

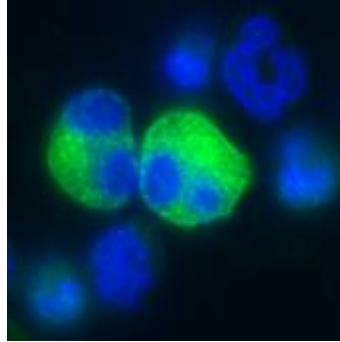
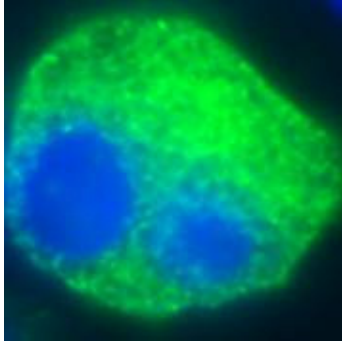


**Abbildung 4-25 Oberflächenverteilung von CXCR3 und CCR5 sowohl auf unstimulierten Neutrophilen Granulozyten, als auch nach 30 min Stimulation mit fMLP. Der Zellkern ist mit DAPI blau gefärbt, die Zellmembran mit ConA grün. Die Rezeptoren leuchten rot.**

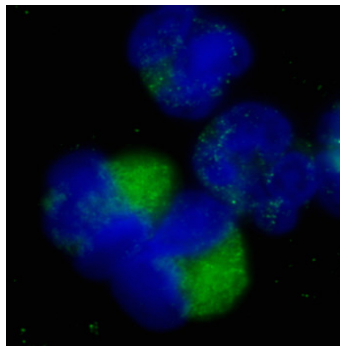
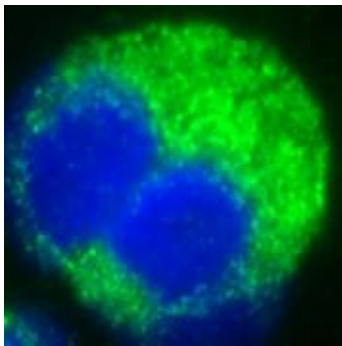
Die Immunfluoreszenzbilder der Abbildung 4-25 stellen eine Aufsicht auf nicht permeabilisierte Neutrophile Granulozyten dar. Das heißt, dass nur die oberflächlichen Rezeptoren von den Antikörpern gebunden wurden. Man sieht eine vermehrte Expression sowohl von CXCR3, als auch von CCR5 nach Stimulation der Zellen mit fMLP für 30 min. CXCR3, welcher auch auf ruhenden Zellen schwach exprimiert ist, wird dabei stärker stimuliert, als CCR5.

### Ohne Stimulation

#### CXCR3



#### CCR5

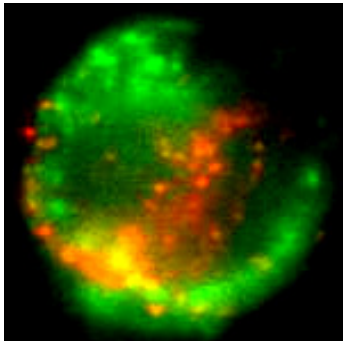


**Abbildung 4-26 Intrazelluläre Verteilung von CXCR3 und CCR5 bei unstimulierten Blutneutrophilen als Nahaufnahme und im Überblick. Die Zellen wurden permeabilisiert. Der Zellkern ist mit DAPI blau gefärbt, die Rezeptoren leuchten grün. Die Zellmembran wurde nicht gefärbt.**

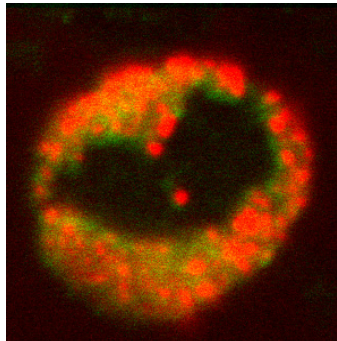
Die Immunfluoreszenzbilder der Abbildung 4-26 zeigen die intrazelluläre Verteilung von CXCR3 und CCR5 in unstimulierten Neutrophilen Granulozyten aus peripherem Blut. Die Zellen wurden dafür permeabilisiert. Man sieht, dass die intrazelluläre Speicherung beider Rezeptoren jeweils von Zelle zu Zelle sehr unterschiedlich ist.

### CXCR3

Blut

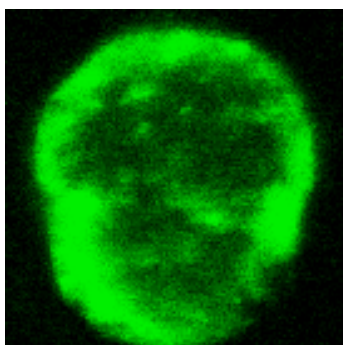


BALF CF

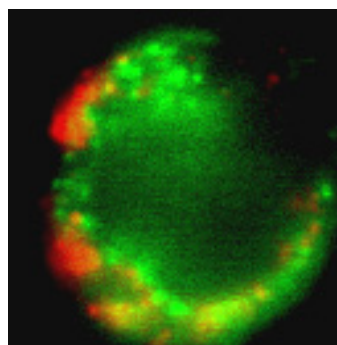


### CCR5

Blut



BALF CF



**Abbildung 4-27 Verteilung der Rezeptoren CXCR3 und CCR5 in ruhenden Blutneutrophilen und Lungenneutrophilen von CF Patienten. Die Zellmembran ist mit ConA grün gefärbt, die Rezeptoren leuchten rot.**

Die Konfokalmikroskopieaufnahmen der Abbildung 4-27 stellen Schnittbilder durch permeabilisierte Neutrophile Granulozyten dar. Sie zeigen die Vermehrung und Umverteilung der Rezeptoren CXCR3 und CCR5 bei Zellen aus der BALF von CF Patienten, verglichen mit Zellen aus peripherem Blut. Sowohl CXCR3, welcher sich in ruhenden Zellen vor allem intrazellulär befindet, als auch CCR5, welcher in ruhenden Zellen nicht exprimiert ist, werden in Lungenneutrophilen von CF Patienten vermehrt exprimiert und an die Zelloberfläche umverteilt.

## 5 Diskussion

In der vorgelegten Studie wurden lösliche und zelluläre Komponenten der angeborenen Immunabwehr bei pädiatrischen Lungenerkrankungen *ex vivo* und *in vitro* untersucht. Wir fanden signifikant erhöhte Spiegel von IL-8 und freier DNA in der BALF von Patienten mit CF und signifikant erhöhte Spiegel von sCD14 im Serum und der BALF von Pneumonie Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die Ergebnisse zu sCD14 legen nahe, dass sich sCD14 im Serum möglicherweise als Marker für Pneumonie im Kindesalter eignet. CCR5 und CXCR3 waren auf Neutrophilen Granulozyten in der BAL von Patienten mit CF und Pneumonie signifikant höher exprimiert im Vergleich zu Neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut. CCR5 und CXCR3 Expression auf Neutrophilen Granulozyten im entzündlichen Milieu könnte ein zukünftiger therapeutischer Ansatzpunkt bei neutrophilen Lungenerkrankungen im Kindesalter sein.

### 5.1 Lösliche Faktoren

#### 5.1.1 sCD14

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen der sCD14 Spiegel in BALF und Serum bei den Patientengruppen CF, Pneumonie und Asthma im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe untersucht (Abb. 4-3, 4-4).

Bei **Pneumonie** waren die Spiegel sowohl in der BALF, als auch im Serum signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Diese hohen Spiegel lassen sich mit der akuten bakteriellen Entzündung erklären. sCD14 ist ein Rezeptor für LPS, aber auch für andere bakterielle Bestandteile, und wird durch diese hoch reguliert (61). Andere Veröffentlichungen beschreiben sCD14 als einen guten Krankheits- und Aktivitätsmarker für bestimmte Erkrankungen. Striz et al. (102) fanden bei ihrer Untersuchung von sCD14 Spiegeln in der BALF von Patienten mit aktiver und inaktiver Sarkoidose, dass sich sCD14 als guter Aktivitätsmarker für diese Krankheit eignet. Pforte et al. (89) zeigten, dass sich sCD14 auch im Serum als guter Aktivitätsmarker für

Sarkoidose eignet. Landmann et al. (62) assoziierten hohe sCD14-Serumspiegel mit einer hohen Mortalität beim Gram-negativen septischen Schock, Burgmann et al. (12) kamen zu vergleichbaren Ergebnissen bei der Gram-positiven Sepsis. Auch für SLE scheint das Serum-sCD14 ein guter Aktivitätsmarker zu sein (Nockher et al. (84)).

Unsere Ergebnisse zeigten bei Pneumonie im Kindesalter sowohl in der BALF, als auch im Serum deutlich erhöhte sCD14 Spiegel gegenüber den Kontrollen. Außerdem waren die sCD14 Spiegel bei Pneumonie auch im Vergleich zu den beiden anderen Lungenerkrankungen CF und Asthma erhöht. Dies spricht dafür, dass erhöhte sCD14 Spiegel nicht allgemein bei Lungenerkrankungen auftreten, sondern eher ein spezifisches Phänomen bei Pneumonie sind.

Es zeigte sich darüber hinaus, dass sCD14 in BALF und Serum bei den Patienten mit Pneumonie positiv miteinander korrelieren (Abb. 4-18). Bei hohen Werten im Serum fanden sich auch hohe Werte in der BALF und umgekehrt. Das Verhältnis BALF : Serum betrug dabei ca. 1 : 1000-10000 (siehe Abb. 4-5). Dies führt zu der Frage, welche Zellen sCD14 produzieren und wo der Ursprung von in der Lunge gefundenem sCD14 liegt. Martin et al. (73) geben für die Herkunft von sCD14 in der Lunge drei Möglichkeiten an:

- passiver Einstrom aus dem Plasma, wenn die Epithelpermeabilität während einer Entzündung steigt
- Abspaltung von der Membran von Alveolarmakrophagen
- lokale Produktion von nicht-myeloiden Zellen (28)

Der Körper reagiert bei der Erkrankung Pneumonie sowohl lokal, als auch systemisch mit einer vermehrten Bildung von sCD14. Die positive Korrelation zwischen Serum- und BALF-Konzentrationen spricht dafür, dass sich sCD14 sowohl der BALF, als auch im Serum als Marker bei Pneumonie eignen würde. Die Durchführung einer BAL ist jedoch eine relativ invasive Prozedur. Die Probengewinnung bei der Testung im Serum ist dagegen technisch einfacher, billiger und für den Patienten schonender durchzuführen.

Bei **CF** zeigten sich unveränderte Serumspiegel für sCD14 im Vergleich zur Kontrollgruppe. CF ist eine chronische Entzündung der Lunge. Im Serum sind die Spiegel unverändert, es gibt also keine systemische Entzündungsreaktion. In der BALF sind die Spiegel erniedrigt, was Zeichen eines chronisch erhöhten Bedarfs und damit vermehrten Verbrauchs sein kann. Martin et al. (72) fanden heraus, dass Kinder mit CF, die einen bestimmten Polymorphismus im CD14 Promotergen hatten, weniger sCD14

bildeten. Außerdem beobachteten sie, dass diese Kinder früher als andere CF Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa* infiziert wurden. Sie schlussfolgerten daraus, dass ein hoher Spiegel an sCD14 einen relativen Schutz vor Infektionen bietet, dann bei einer Keimbesiedelung aber zu einer stärkeren Entzündungsreaktion führt. sCD14 spielt folglich eine entscheidende Rolle bei der Balance zwischen Infektion und Entzündung bei CF.

CF ist, im Gegensatz zu der akuten Pneumonie, eine lokale chronische Lungenerkrankung. Während sCD14 als Akut Phase Protein (7) bei Pneumonie sowohl lokal, als auch systemisch ansteigt, hat es bei CF eher lokale Bedeutung und ist vermutlich durch den chronischen Verbrauch in der Konzentration erniedrigt.

Bei **Asthma**, als einer allergischen und nicht primär infektiösen Lungenerkrankung, fanden sich sowohl im Serum, als auch in der BALF sCD14 Werte, die mit denen der gesunden Kontrollgruppe vergleichbar waren. Andere Studien zeigten erhöhte sCD14 Werte in der BALF von Asthmapatienten, wobei hier direkt nach Allergenexposition gemessen wurde (Dubin et al. (25), Virchow et al. (108)). Die Patienten unserer Untersuchung wurden nicht einer Allergenprovokation unterzogen. Es handelt sich bei der sCD14 Erhöhung bei Asthma wohl am ehesten um eine akute Reaktion bei Allergenexposition. Auch bei Asthma fungiert sCD14 wahrscheinlich als Akut Phase Protein.

Um zu untersuchen, bei welchen **bakteriellen TLR-Liganden** sCD14 reaktiv ansteigt, stimulierten wir Neutrophile Granulozyten mit verschiedenen bakteriellen Bestandteilen (Abb. 4-9). Die Ergebnisse zeigten, dass sCD14, auch LPS-Rezeptor genannt (120), nicht nur auf das von Gram-negativen Bakterien gebildete LPS (TLR 4) reagiert, sondern in unterschiedlichem Maß auch auf alle anderen, von uns untersuchten, Liganden. Wie LPS hatte auch unmethylierte CpG-DNA (TLR 9) einen sehr starken Effekt auf die Freisetzung von sCD14. Die gemessene Konzentration lag nach Stimulation mit diesen beiden Liganden jeweils doppelt so hoch wie nach Inkubation der Zellen in reinem Nährmedium. PMA, fMLP, Peptidoglykan (TLR 2), das synthetische Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (TLR 1/2) und Flagellin von begeißelten Bakterien (TLR 5) konnten ebenfalls eine gesteigerte sCD14 Produktion provozieren. Dieser Effekt war jedoch geringer ausgeprägt, als bei LPS und CpG. Auf die Stimulation mit Zymosan (TLR 2/6), ein Präparat aus Hefezellwänden, reagierten die Neutrophilen Granulozyten lediglich mit einem sehr dezenten Anstieg der sCD14 Spiegel. Die

Freisetzung von sCD14 wird folglich als Reaktion auf diverse Liganden stimuliert. Über welchen Mechanismus die einzelnen Liganden zu einer vermehrten Freisetzung von sCD14 durch Neutrophile Granulozyten führen, muss Gegenstand weitergehender Untersuchungen sein.

Die Resultate verschiedener Studien ergaben, dass sich die Konzentrationen von sCD14 in der BALF oder im Serum bei bestimmten Lungen- und nicht-Lungenerkrankungen verändern. Hohe Spiegel von diesem Akut Phase Protein (7) findet man bei Entzündungen, niedrige Spiegel bei vermehrtem Verbrauch z.B. postoperativ (45), oder bei Polytrauma (59). Die folgenden beiden Tabellen (5-1 und 5-2) zeigen die Ergebnisse von sCD14 Messungen in BALF bzw. Serum anderer Forschungsgruppen.

Diagnose	Anzahl	Mittelwert (ng/ml)	Vergleich mit Kontrolle	Bemerkung	Referenz
aktive Sarkoidose	13	58	580%	guter Aktivitätsmarker	(102)
inaktive Sarkoidose	9	13	130%		
IPF	6	5	50%		
Kontrolle	8	10		p<0.01	
Tuberkulose	12	34,4	299%		(46)
Kontrolle	12	11,5		p=0,02	
Allergisches Asthma	12	110	3188%	LBP auch hoch p<0.02	(25)
Kontrolle	12	3,45			
Atopisches Asthma 18h nach Allergen Gabe	8	45,1	425%	p=0,01	(108)
Atopisches Asthma ohne Allergen Gabe	8	10,6			
stabil nach LTX	26	11,5	192%	früher Marker für Bronchiolitis obliterans Syndrom p<0,001	(111)
Kontrolle	19	6			

**Tabelle 5-1 sCD14 Messungen in der BALF**



Diagnose	Anzahl	Mittelwert (ng/ml)	Vergleich mit Kontrolle	Bemerkung	Referenz
Polytrauma	16	1700	46%		(59)
Polytrauma nach 6 Tagen	16	4900	132%		
Brandopfer > 35%	5	erhöht			
Kontrolle	30	3700			
Psoriasis	17	4059	151%	p=0,001	(98)
Kontrolle	17	2687			
EAA		4600	144%		(90)
Kontrolle		3200			
Sarkoidose		5300	166%	guter Aktivitätsmarker	(89)
Kontrolle		3200			
HIV	115	2900	132%	p < 0.001	(83)
Kontrolle	78	2200			
Septischer Schock	54	3239	131%	Hohe Spiegel sind assoziiert mit hoher Mortalität p= 0.002	(62)
Kontrolle	26	2480			
Malaria mit Nierenschaden	16	8116	292%		(113)
Malaria ohne Nierenschaden	29	9453	341%		
Gram-neg. Septikämie	14	6155	222%		
Kontrolle	24	2776			
HIV-1 asymptomatisch	29	3000	120%	p<0.001	(65)
HIV-1 symptomatisch	22	3500	140%		
HIV-1 + AIDS	41	7000	280%		
Kontrolle	21	2500			
Prae-OP	40	5600		p<0.05	(45)
Post-OP	40	4600	82%		
Periodontitis	38	3200	121%	p<0.01	(42)
Kontrolle	25	2650			
Tuberkulose	30	6600	213%	p< 0.0001	(63)
Tuberkulose+HIV	20	8700	281%	p< 0.0001	
HIV	25	4100	132%	p< 0.01	

Kontrolle	30	3100			
Lyme disease early stage	18	3058	145%	p=0.0001	(66)
Lyme disease late stage	18	2684	128%	p=0.0007	
Posttreatment chronic LD	20	2196	104%	p=0.078	
Kontrolle	20	2104			
stabil nach LTX	26	6200	258%	p<0,05	(111)
Kontrolle	19	2400			
Nephrotisches Syndrom		1230	69%	p< 0.003	(14)
Remission		1770			
Rheumatoide Arthritis	29	2400	141%	p<0.0001	(7)
Reaktive Arthritis	38	2100	124%		
Crystal-induced arthritis	26	2900	171%		
Kontrolle	58	1700			
Brucellose	37	10040	207%	p< 0.001	(4)
Kontrolle	36	4850			
Sepsis Gram-pos. Nonsurvivors	8	6120	192%	Hohe Spiegel assoziiert mit hoher Mortalität p< 0.01	(12)
Sepsis Gram-pos. Survivors	20	3530	111%		
Kontrolle	10	3190			
aktiver SLE	17	6900	329%	Guter Aktivitätsmarker p< 0.0001	(84)
Inaktiver SLE	35	4100	195%		
Kontrolle	65	2100			

**Tabelle 5-2 sCD14 Messungen im Serum**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sCD14 allgemein bei bakteriellen Entzündungen ansteigt. Nach aktueller Datenlage wurde sCD14 bis jetzt noch nicht im Zusammenhang mit der Erkrankung Pneumonie untersucht. sCD14 im Serum erwies sich als ein möglicher Marker bei Pneumonie im Kindesalter.

### 5.1.2 SP-D

Das Surfactant assoziierte Molekül SP-D hat eine wichtige Funktion in der pulmonalen Immunabwehr und –modulation inne und zeigt vielseitige Interaktionen mit anderen Bestandteilen des angeborenen Immunsystems der Lunge u.a. mit CD14. SP-D ist in der Lage mit seiner CR-Domäne an mCD14/sCD14 zu binden, die Interaktionen zwischen mCD14/sCD14 und LPS zu blockieren und so eine inflammatorische Antwort zu verhindern (Abb. 1-2). Es stellt so zu sagen einen negativen Feedback Mechanismus dar, um eine Chronifizierung der Entzündung zu unterbinden (97). Bei Mäusen führte ein Mangel an SP-D zu einer Abspaltung von CD14 von der Oberfläche und dadurch zu einer verminderten Aufnahme von LPS durch Makrophagen. Das dadurch erhöhte sCD14 stimulierte die TNF $\alpha$ -Produktion und hatte eine starke Entzündung zur Konsequenz (100). SP-D wirkt folglich anti-inflammatorisch.

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen der SP-D Spiegel in BALF und Serum bei den Patientengruppen Pneumonie, CF und Asthma im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe untersucht (Abb. 4-1, 4-2).

Bei **Pneumonie** waren die Spiegel von SP-D sowohl in der BALF, als auch im Serum gegenüber der Kontrollgruppe tendenziell erhöht. Daimon et al. (20) fanden bei Patienten mit akuter eosinophiler Pneumonie in der BALF erhöhte SP-D Werte im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe, während Atochina et al. (3) im Mausmodell erhöhte SP-D Spiegel in der BALF bei *Pneumocystis carinii* Pneumonie provozieren konnte. Arai et al. (2) untersuchten das Serum von Kindern mit Masernpneumonie und beschrieben erhöhte SP-D Spiegel. In die gleiche Richtung zeigen die Ergebnisse von Honda et al. (47): die Serumspiegel von SP-D waren bei Patienten mit bakterieller Pneumonie erhöht. Die von uns analysierten Werte bei Kindern mit Pneumonie bestätigen somit bisherige Studien.

Bei **CF** zeigten sich tendenziell erhöhte SP-D Konzentrationen in der BALF und tendenziell erniedrigte Konzentrationen im Serum im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Im Vergleich dazu untersuchten Postle et al. (92) 11 CF Patienten mit einer akuten Infektion der Lunge und fanden in der BALF Werte, die auf 0,02% der Kontrollgruppe erniedrigt waren. Auch Noah et al. (81) beschrieben bei jungen CF Patienten mit klinisch aktiver Erkrankung erniedrigte SP-D Spiegel in der BALF. SP-D Spiegel im Serum von CF Patienten wurden von Krane et al. (58) gemessen. Sie unterschieden CF Patienten mit und ohne ABPA und fanden jeweils erhöhte Spiegel im Vergleich zur

Kontrollgruppe, wobei bei Patienten mit ABPA die SP-D Spiegel noch höher lagen, als bei den Patienten ohne ABPA.

Erniedrigte SP-D Spiegel in der BALF lassen sich durch vermehrten Verbrauch, proteolytische Degradation (z.B. durch Neutrophilen-Proteasen (39; 106) oder Pseudomonas-Elastase (71)) oder durch vermehrten Efflux aus dem Alveolarraum in die Blutbahn erklären. Die Permeabilität der Alveolar-Blut-Schranke steigt bei einer Entzündung an, was erhöhte Spiegel im Serum erklären kann. Griesse et al. (36) wiesen hingegen anhand klinisch stabiler CF Patienten nach, dass ein Zusammenhang zwischen Ausmaß der Entzündung (gemessen an dem Prozentsatz von Neutrophilen Granulozyten) und dem SP-D Spiegel in der BALF besteht: Je stärker die Entzündung, desto weniger SP-D ist detektierbar. Dies ist möglicherweise eine Schutzreaktion des Körpers, um eine überschießende proinflammatorische Kaskade zu verhindern (31). Die SP-D Spiegel in der BALF von CF Patienten können folglich entweder erhöht oder erniedrigt sein, je nachdem wo sich die Balance zwischen Synthese/Freisetzung, Metabolismus und/oder Clearance einpendelt.

Die Entzündungsreaktion bei CF Patienten zeigt einen progredienten Verlauf, mit steigendem Alter nimmt die Krankheitsaktivität und Menge an Proteasen in der Lunge zu. Die von uns untersuchte CF Patientengruppe war im Durchschnitt eher jung (Alter 11,4 Jahre) mit einer relativ milden Atemwegserkrankung (47,5% Neutrophile in BALF). Man kann also vermuten, dass unsere Patienten deswegen keine erniedrigten SP-D Spiegel aufwiesen, weil die Degradation durch Proteasen noch nicht weit fortgeschritten war und ihr Körper noch nicht im adaptiven Kompensationsstadium angelangt war. Sie hatten noch gering erhöhte Werte im Sinne einer leichten Entzündung.

Bei Kindern mit **Asthma** fanden sich folgende Abweichungen von der Kontrollgruppe: Die SP-D Spiegel in der BALF waren erhöht, im Serum tendenziell erniedrigt. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von anderen Studien bei Erwachsenen: Cheng et al. (15) untersuchten die BALF von Asthmapatienten und fanden erhöhte Werte. Koopmans et al. (57) beschrieben im Serum von Asthma-Patienten erhöhte Werte, Honda et al. (47) dagegen erniedrigte. Die hohen SP-D Spiegel in der BALF lassen sich dadurch erklären, dass SP-D antiallergisch wirkt: es verhindert die Histaminfreisetzung aus Basophilen Granulozyten (frühe allergische Reaktion) und die allergeninduzierte Lymphozytenproliferation (späte allergische Reaktion) (110). SP-D wird folglich bei Allergenexposition reaktiv hochreguliert.

Andere Studien zeigten bereits, dass die Konzentrationen von SP-D in der BALF und/oder im Serum bei bestimmten Erkrankungen ansteigen oder abfallen (Tabelle 5-3 und 5-4). Während erhöhte Werte Folge von vermehrtem Bedarf und/oder verminderter Clearance sein können, sind erniedrigte Werte wohl am ehesten auf gesteigerten Metabolismus z.B. durch proteolytischen Abbau zurückzuführen. Bei der Frage, wie SP-D bei einer Entzündung aus der Lunge in die Zirkulation gelangt, gibt es mehrere Hypothesen (40):

- Während der entzündlichen Vorgänge steigt die Permeabilität der Lungenblutgefäße, was in einem Leck zwischen Alveolarraum und Gefäß resultieren könnte.
- Die Integrität der SP-D produzierenden Zellen könnte gestört sein, was zu einem Efflux von SP-D auch in die Blutgefäße führt.
- Die Clearance von SP-D aus der Zirkulation könnte während eines entzündlichen Prozesses gestört sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SP-D bei den von uns untersuchten Lungenerkrankungen, außer einer leichten Erhöhung im Serum von Asthmatikern keine signifikanten Abweichungen zur Kontrollpopulation zeigten. Somit bietet sich SP-D nicht als Krankheitsmarker bei den von uns untersuchten pädiatrischen Lungenerkrankungen im Kindesalter an.

Diagnose	Anzahl	Mittelwert (ng/ml)	Vergleich mit Kontrolle	Bemerkung	Referenz
CF + Infektion	11	12	0,02%		(92)
Kontrolle	11	641			
CF	76	5	71%	Inverse Korrelation zw. SP-D und Neutrophilen	(36)
Kontrolle	10	7			
CF	46	12000	43%		(81)
Tracheostoma	17	20000	71%		
Kontrolle	31	28000			
Tracheostoma	44	9	47%	Inverse Korrelation zw. SP-D und Neutrophilen bzw. Bakterien	(37)
Kontrolle	11	19			
ARDS	38	3667		SP-D korreliert mit Krankheitsschwere	(16)
ARDS	63	700	70%	Weniger SP-D bei Nichtüberl. als bei Überlebenden	(34)
Kontrolle	35	1000			
Raucher	8	500	39%		(48)
Kontrolle	12	1300			
PAP	8	19300	2193%	SP-D Spiegel fallen nach BAL ab	(47)
ILD	7	620	70%		
IPF	33	580	66%		
Sarkoidose	32	970	110%		
Kontrolle	28				
GÖR	20	174	34%	Gestörte Multimerisation	(38)
Kontrolle	17	518			
RSV	18	130	22%		(52)
Kontrolle	16	600			
Eosinphile Pneumonie	5	1693	864%		(20)
Kontrolle	7	196			
Asthma	10	620	148%		(15)
Kontrolle	11	420			

**Tabelle 5-3 Surfactant Protein D Level in der BALF (40)**

Diagnose	Anzahl	Mittelwert (ng/ml)	Vergleich mit Kontrolle	Bemerkung	Referenz
CF mit ABPA	11	139	211%	inverse Korrelation zw. SP-D und FVC/FEV1	(58)
CF ohne ABPA	11	120	182%		
Kontrolle	19	66			
ARDS	370	Tod: 101	138%		(26)
		Lebend: 73			
Hypersensitive Pneumonitis	49	201	296%	inverse Korrelation zw. SP-D und TLC	(50)
Kontrolle	47	68			
IPF	143	391	399%		(33)
ARDS	21	300	306%		
Kontrolle	45	98			
Strahlenpneumonie	25	145	184%		(103)
Kontrolle	25	79			
Interstitielle Pneumonie nach Masern	13	1658	2700%	Abfall nach Steroidtherapie	(2)
Kontrolle	13	61			
Kinder mit ILD	10	304	405%	inverse Korrelation zw. SP-D und FEV1	(1)
Kontrolle	10	75			
ILD bei Poly-/Dermatomyositis	59	119	310%	inverse Korrelation zw. SP-D und VC	(49)
Kontrolle	59	39			
Sarkoidose	79	100	147%		(51)
Kontrolle	38	68			
Eosinophile Pneumonie	5	261			(20)
Asthma	25	65	130%		(57)
Kontrolle	25	50			
PAP	8	460	698%		(47)
Asthma	28	59	89%		
Bakterielle Pneumonie	11	82	124%		
Kontrolle	28	66			

**Tabelle 5-4 Surfactant Protein D Level im Serum (40)**

### 5.1.3 IL-8

IL-8 zählt zu den proinflammatorischen Mediatoren. In unserer Studie untersuchten wir die IL-8 Konzentrationen bei Pneumonie, CF, Asthma und gesunden Kontrollen unter dem Gesichtspunkt des Entzündungsgrades (Abb. 4-10, 4-11).

Bei **Pneumonie** waren die IL-8 Spiegel sowohl in der BALF, als auch im Serum gegenüber den Kontrollen erhöht. Dies kann man als Zeichen der lokalen Entzündung, aber auch der systemischen Mitreaktion sehen. Tumgor et al. (105) untersuchten Serum von Patienten mit ambulant oder nosokomial erworbener Pneumonie und einer Kontrollgruppe. Bei beiden Formen der Pneumonie waren die Serumkonzentrationen von IL-8 gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, es konnte jedoch anhand der Serum IL-8 Spiegel keine Unterscheidung der beiden Ätiologien getroffen werden.

Die IL-8 Spiegel in der BALF waren bei **CF** stark erhöht, wie zuvor beschreiben von Bonfield et al. (10). Auch bei **Asthma** waren sie tendenziell erhöht gegenüber den Kontrollwerten, was in Einklang mit den Ergebnissen von Nocker et al. (82) steht. Anders als bei Pneumonie zeigten sich bei CF und Asthma jedoch im Serum geringere Konzentrationen von IL-8 als bei den Kontrollen. Bei den uns zur Verfügung gestandenen Serumproben von Asthma und CF Patienten, lagen viele in ihren IL-8 Konzentrationen unter dem Messbereich. Ähnliche Probleme beschrieben Wolter et al., die untersuchten, ob sich IL-8 im Serum als Verlaufsparmeter bei CF eignet (116). Auch bei ihren Untersuchungen lagen die Serum IL-8 Spiegel zum größten Teil unterhalb der Messgrenze. Es ist möglich, dass die interindividuellen Unterschiede in der Serumkonzentration von IL-8 so hoch sind, dass sich dieser Parameter nicht gut als Indikator für die Schwere der Erkrankung eignet.

Zusammenfassend konnten unsere Messungen zeigen, dass IL-8 in der BALF bei CF Patienten erhöht ist, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch gegenüber den anderen untersuchten Lungenerkrankungen Pneumonie und Asthma.

### 5.1.4 Freie DNA

Bei Kindern mit **CF** waren die Konzentrationen von freier DNA massiv gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abb. 4-12). Kirchner et al. (53) kamen bei ihren BALF Untersuchungen von Kindern mit CF zu vergleichbaren Resultaten. Erklären lässt sich dies durch die chronische neutrophile Entzündung in den Lungen dieser Patienten. Der



Schleim wird durch die freie DNA zäher, was die Clearance erschwert. Die chronische Verschleimung und schlechte Belüftung der Lungen bei CF Patienten bietet einen guten Nährboden für die Besiedelung mit Bakterien. Diese Tatsache wiederum führt zur weiteren Rekrutierung von Entzündungszellen, zum fortschreitenden Gewebeumbau und so zu einem Teufelskreis. Ratjen et al. (94) beschrieben, dass eine frühe Behandlung mit DNase den Schleim von CF Patienten verflüssigt, die Clearance steigert und den strukturellen Umbau der Lunge verringern kann.

Auch bei Kindern mit **Pneumonie** konnten wir deutlich erhöhte Werte für freie DNA finden. Diese waren jedoch im Vergleich zu CF niedriger. Der Grund dafür ist vermutlich, dass es sich bei Pneumonie im Gegensatz zu CF um eine akute, vorübergehende und nicht chronische, Entzündung der Lunge handelt.

Bei Kindern mit **Asthma** als einer allergischen Erkrankung, fanden wir zwar auch leicht erhöhte DNA Spiegel, dies war jedoch nicht signifikant. Die Werte bei Asthma erreichten nicht die Höhe von den infektiös, entzündlichen Erkrankungen.

Die hier diskutierte Arbeit zeigt weiterhin, dass bei Pneumonie (Abb. 4-14) und CF (Abb. 4-13) freie DNA und SP-D in der BALF negativ miteinander korrelierten. Bei viel freier DNA war wenig SP-D nachweisbar. Bei der Asthma- und der Kontrollgruppe (Abb. 4-15, 4-16), bei denen insgesamt wenig DNA nachweisbar war, konnten wir keinen Zusammenhang feststellen.

Palaniyar et al. beschrieben, dass SP-D freie DNA bindet (87), dadurch die Aufnahme durch Makrophagen fördert und die Autoantikörperbildung minimiert (86). Der Zusammenhang lässt sich daher so verstehen, dass bei einer starken Entzündung viel DNA frei wird. SP-D bindet diese und wird dadurch vermehrt verbraucht. Es ist folglich wenig SP-D nachweisbar.

Sowohl bei CF, als auch bei Pneumonie konnten wir also *ex vivo* zeigen, dass durch Entzündung bedingte hohe Konzentrationen von freier DNA zu einem vermehrten Verbrauch und damit Abfall von SP-D führen. Es steht daher weniger SP-D zur Beseitigung exogener Pathogene zur Verfügung. Eine Behandlung mit inhalativer DNase bei CF dürfte folglich nicht nur einen positiven Effekt auf die Clearance des verflüssigten Schleims haben, sondern sich auch günstig auf die Abwehrlage des Patienten auswirken.

## 5.2 Zelluläre Faktoren

Es besteht ein feines Gleichgewicht zwischen antibakteriellen und gewebezerstörenden Effekten bei der Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten in ein entzündliches Gewebe. Diese Balance bestimmt den Ausgang bei chronisch entzündlichen Erkrankungen. Eine wichtige regulatorische Rolle spielen dabei die Chemokine und ihre Rezeptoren.

Wir untersuchten die Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR3 als inflammatorische Chemokinrezeptoren auf Neutrophilen Granulozyten in der BALF und analysierten *in vitro*, welche Faktoren die Expression von CCR5 und CXCR3 auf Neutrophilen Granulozyten beeinflussen.

### 5.2.1 CCR5

Wir untersuchten mittels Durchflußzytometrie, wie sich die Oberflächenexpression von CCR5 auf menschlichen Neutrophilen Granulozyten in der BALF bei den Lungenerkrankungen CF, Pneumonie und Asthma im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe verändert (Abb. 4-21). CCR5 war am stärksten bei CF und Pneumonie exprimiert, bei CF noch etwas stärker als bei Pneumonie. Die Expression bei den Zellen der Asthma Gruppe war leicht erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. CCR5 als inflammatorischer Chemokinrezeptor (76) wurde also bei allen drei untersuchten Lungenerkrankungen hochreguliert.

Um nachzuahmen, wodurch CCR5 auf Neutrophilen Granulozyten in der Lunge induziert wird, inkubierten wir Neutrophile Granulozyten mit Stimulantien, welche bei bakteriellen Lungenerkrankungen im Alveolarraum präsent sind: (a) TLR Liganden und (b) pro-inflammatorische Zytokine. Nach anschließender Proteindetektion im Western Blot wurde untersucht welche Liganden in welchem Umfang einen Einfluss auf die CCR5-Expression haben (Abb. 4-22, 4-23). Unsere Untersuchungen ergaben: CCR5, welcher auf unstimulierten Neutrophilen Granulozyten nicht nachweisbar war, wurde nach PMA Stimulation maximal erhöht. Schwächer wirkten in absteigender Reihenfolge LPS, fMLP, Zymosan, IL-8, IL-1 $\beta$ , PGN und Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>. Bei Stimulation mit ODN, Flagellin und TNF $\alpha$  konnte kein Effekt gezeigt werden.

Es zeigte sich weiterhin, dass die Zugabe von Dexamethason, als potentes Antiinflammationsmittel, einen dämpfenden Effekt auf die Wirkung der einzelnen

Stimulantien hatte. Die Bandenintensität bei PMA, fMLP, LPS und PGN wurde deutlich schwächer. Bei Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, ODN, Flagellin und Zymosan war CCR5 nach Dexamethason Zugabe nicht mehr nachweisbar.

Die Expression von CCR5 auf stimulierten Neutrophilen Granulozyten und auf Neutrophilen Granulozyten aus der BALF von lungenkranken Patienten wurde mittels Mikroskopie bestätigt (Abb. 4-25, 4-26, 4-27). Mit unseren Untersuchungen konnten wir *ex vivo* und *in vitro* zeigen, dass CCR5, welcher auf ruhenden Neutrophilen Granulozyten nicht exprimiert wird, durch bestimmte entzündliche Faktoren auf der Oberfläche von Neutrophilen Granulozyten erscheint. Corticosteroide könnten einen dämpfenden Effekt auf inflammatorische Lungenerkrankungen durch eine Inhibition der durch Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, ODN, Flagellin und Zymosan induzierten CCR5 Expression ausüben.

### 5.2.2 CXCR3

Es ist bekannt, dass CXCR3 auf aktivierten T-Lymphozyten bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie CF oder Rheumatoide Arthritis exprimiert wird (93). Auf Neutrophilen wurde bislang noch keine Expression beschrieben. Trotz der großen Ähnlichkeit zu CXCR1 und 2, welche stark auf Neutrophilen exprimiert sind (70), ist CXCR3 nicht als Oberflächenrezeptor auf ruhenden Neutrophilen bekannt.

Bei unseren Untersuchungen wurden die Veränderungen der Oberflächenexpression von CXCR3 auf Neutrophilen Granulozyten aus der BALF von Patienten mit CF, Pneumonie und Asthma mittels Durchflußzytometrie gemessen (Abb. 4-21). Wie auch bei CCR5 war CXCR3 bei CF und Pneumonie am stärksten, wobei hier die Expression bei Pneumonie höher war, als bei CF. Die Asthma- und Kontrollgruppe unterschieden sich kaum.

Ebenso wie bei CCR5 wurde in den Lysaten der stimulierten Zellen auch CXCR3 mittels Western Blot detektiert (Abb. 4-22, 4-24). CXCR3 war bei unstimulierten Zellen sehr schwach nachweisbar und wurde durch PMA maximal erhöht. LPS, fMLP und PGN stellten ebenfalls sehr starke Reize dar. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8 und Zymosan wirkten schwächer und Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> nur sehr leicht. Keinen Effekt hatten ODN und Flagellin. Allgemein lässt sich sagen, dass CXCR3 sowohl bei den Untersuchungen in der BALF mittels Durchflußzytometrie, als auch im Western Blot stärker exprimiert war als CCR5.

Auch die Expression von CXCR3 auf stimulierten Neutrophilen Granulozyten und auf Zellen aus der BALF von lungenkranken Patienten wurde mittels Mikroskopie bestätigt (Abb. 4-25, 4-26, 4-27).

Wir konnten folglich mit unseren Versuchen *ex vivo* und *in vitro* beweisen, dass CXCR3 sowohl schwach auf ruhenden Neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, als auch durch bestimmte entzündliche Faktoren auf der Oberfläche hoch reguliert wird.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Neutrophile Granulozyten in dem inflammatorischen Milieu im Alveolarraum bei bakteriellen Lungenerkrankungen *in situ* durch Aktivierung und durch spezifische Stimulation durch TLR Liganden ihr Oberflächenexpressionsprofil ändern. Die inflammatorischen Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 können im entzündlichen Milieu hochreguliert werden. Die funktionelle Relevanz der CCR5 und CXCR3 Expression auf Neutrophilen Granulozyten war nicht Gegenstand unserer Untersuchungen und bleibt daher unklar. Weitere Analysen werden nötig sein, um zu prüfen, ob dies ein zukünftiger therapeutischer Ansatzpunkt sein könnte.

## 6 Zusammenfassung

Angeborene Abwehrmechanismen sind für die physiologische Funktion der Lunge entscheidend. Sie bestimmen, ob die Inhalation von Umweltstoffen als harmlos erkannt wird, oder zu einer Aktivierung der Immunabwehr führt. Bei Patienten mit Lungenerkrankungen werden angeborene Abwehrmechanismen aktiviert, um Pathogene zu erkennen und zu eliminieren. Diese Arbeit untersuchte, welche löslichen und zellulären Abwehrmechanismen der Lunge bei Lungenerkrankungen im Kindesalter aktiviert werden. Untersucht wurden die Patientengruppen Pneumonie, Cystische Fibrose und Asthma. Es wurde dabei *ex vivo* mit den Methoden ELISA und FACS und *in vitro* mit Zellkultur und anschließend Western Blot und Mikroskopie gearbeitet.

Bei Patienten mit Pneumonie waren die Spiegel von sCD14 im Serum und der BALF im Vergleich zu den anderen Patientengruppen und den Kontrollkindern signifikant erhöht. Ebenfalls war die Konzentration von freier DNA und IL-8 in der BALF signifikant erhöht. Bei CF Patienten fand sich eine signifikante Ansammlung von IL-8 und freier DNA in der BALF verglichen mit den anderen Gruppen. Patienten mit Asthma hatten erhöhte SP-D Spiegel in der BALF. Es zeigte sich bei den Pneumonie- und CF-Gruppen eine negative Korrelation zwischen freier DNA und SP-D sowie eine positive Korrelation zwischen sCD14 in BALF und Serum. Unsere Untersuchungen weisen auf eine wichtige Rolle von IL-8 und freier DNA bei CF und SP-D bei Asthma Patienten hin. Darüber hinaus zeigen unsere Ergebnisse, dass sich sCD14 im Serum möglicherweise als Marker für Pneumonie im Kindesalter eignet.

Neutrophile Granulozyten in der BALF von CF und Pneumonie Patienten exprimierten die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3, was bei Kontrollprobanden nicht bzw. nicht so stark der Fall war. *In vitro* konnte die Expression von CCR5 und CXCR3 durch Stimulation mit bakteriellen TLR-Liganden und pro-inflammatorischen Zytokinen induziert werden. Die Expression von CCR5 und CXCR3 auf Neutrophilen Granulozyten im entzündlichen Milieu könnte ein zukünftiger therapeutischer Ansatzpunkt sein.

## 7 Literaturverzeichnis

### Reference List

1. **Al Salmi QA, Walter JN, Colasurdo GN, Sockrider MM, Smith EO, Takahashi H and Fan LL.** Serum KL-6 and surfactant proteins A and D in pediatric interstitial lung disease. *Chest* 127: 403-407, 2005.
2. **Arai Y, Obinata K, Sato Y, Hisata K, Tadokoro R, Tawa T and Kinoshita K.** Clinical significance of the serum surfactant protein D and KL-6 levels in patients with measles complicated by interstitial pneumonia. *European Journal of Pediatrics* 160: 425-429, 2001.
3. **Atochina EN, Beck JM, Scanlon ST, Preston AM and Beers MF.** Pneumocystis carinii pneumonia alters expression and distribution of lung collectins SP-A and SP-D. *J Lab Clin Med* 137: 429-439, 2001.
4. **Ayaslioglu E, Tekeli E and Birengel S.** Significant elevation of serum soluble CD14 levels in patients with brucellosis. *Jpn J Infect Dis* 58: 11-14, 2005.
5. **Babior BM.** Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64: 959-966, 1984.

6. **Baggiolini M, Dewald B and Moser B.** Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55: 97-179, 1994.
7. **Bas S, Gauthier B, Spenato U, Stingelin S and Gabay C.** CD14 is a acute-phase protein. *J Immunol* 172: 4470-4479, 2006.
8. **Bazil V.** Physiological enzymatic cleavage of leukocyte membrane molecules. *Immunol Today* 16: 135-140, 1995.
9. **Blaiss MS and Hill B.** Outcomes in pediatric asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 5: 431-436, 2005.
10. **Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H and Berger M.** Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 2111-2118, 1995.
11. **Bufler P, Stiegler G, Schuchmann M, Hess S, Kruger C, Stelter F, Eckerskorn C, Schutt C and Engelmann H.** Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *Eur J Immunol* 25: 604-610, 1995.
12. **Burgmann H, Winkler S, Locker GJ, Prestler E, Laczika K, Staudinger T, Knapp S, Thalhammer F, Wenisch C, Zedwitz-Liebenstein K, Frass M and Graninger W.** Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in gram-positive sepsis. *Clin Immunol Immunopathol* 80: 307-310, 1996.

13. **Busse WW and Lemanske RF Jr.** Asthma. *N Engl J Med* 344: 350-362, 2001.
14. **Chen SP, Cheung W, Heng CK, Jordan SC and Yap HK.** Childhood nephrotic syndrome in relapse is associated with down-regulation of monocyte CD14 expression and lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor-alpha production. *Clin Exp Immunol* 134: 111-119, 2003.
15. **Cheng G, Ueda T, Numao T, Kuroki Y, Nakajima H, Fukushima Y, Motojima S and Fukuda T.** Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma. *European Respiratory Journal* 16: 831-835, 2000.
16. **Cheng IW, Ware LB, Greene KE, Nuckton TJ, Eisner MD and Matthay MA.** Prognostic value of surfactant proteins A and D in patients with acute lung injury. *Critical Care Medicine* 31: 20-27, 2003.
17. **Crouch EC.** Surfactant protein-D and pulmonary host defense. *Respir Res* 1: 93-108, 2000.
18. **Crouch E and Wright JR.** Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annual Review of Physiology* 63: 521-554, 2001.
19. **da Silva CJ and Ulevitch RJ.** MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem* 277: 1845-1854, 2002.



20. **Daimon T, Tajima S, Oshikawa K, Bando M, Ohno S and Sugiyama Y.** KL-6 and surfactant proteins A and D in serum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute eosinophilic pneumonia. *Intern Med* 44: 811-817, 2005.
  
21. **Davis PB.** Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 475-482, 2006.
  
22. **Delves PJ and Roitt IM.** The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343: 108-117, 2000.
  
23. **Delves PJ and Roitt IM.** The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343: 37-49, 2000.
  
24. **Dentener MA, Bazil V, Vonasmuth EJU, Ceska M and Buurman WA.** Involvement of Cd14 in Lipopolysaccharide-Induced Tumor-Necrosis-Factor-Alpha, Il-6 and Il-8 Release by Human Monocytes and Alveolar Macrophages. *Journal of Immunology* 150: 2885-2891, 1993.
  
25. **Dubin W, Martin TR, Swoveland P, Leturcq DJ, Morairty A, Tobias PS, Bleecker ER, Goldblum SE and Hasday JD.** Asthma and endotoxin: lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 in bronchoalveolar compartment. *Am J Physiol* 270: 736-744, 1996.

26. **Eisner MD, Parsons P, Matthay MA, Ware L and Greene K.** Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Thorax* 58: 983-988, 2003.
  
27. **Elias JA, Zhu Z, Chupp G and Homer RJ.** Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 104: 1001-1006, 1999.
  
28. **Fearns C, Kravchenko VV, Ulevitch RJ and Loskutoff DJ.** Murine CD14 gene expression in vivo: extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 181: 857-866, 1995.
  
29. **Fisher JH and Mason R.** Expression of pulmonary surfactant protein D in rat gastric mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 13-18, 1995.
  
30. **Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB and Wright SD.** Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 176: 1665-1671, 1992.
  
31. **Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE and Henson PM.** By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 115: 13-23, 2003.

32. **Goyert SM, Ferrero EM, Seremetis SV, Winchester RJ, Silver J and Mattison AC.** Biochemistry and expression of myelomonocytic antigens. *J Immunol* 137: 3909-3914, 1986.
  
33. **Greene KE, King TE, Kuroki Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake GW, Newman LS, Nagae H and Mason RJ.** Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* 19: 439-446, 2002.
  
34. **Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull W, Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD and Martin TR.** Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160: 1843-1850, 1999.
  
35. **Griese M.** Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *European Respiratory Journal* 13: 1455-1476, 1999.
  
36. **Griese M, Essl R, Schmidt R, Rietschel E, Ratjen F, Ballmann M and Paul K.** Pulmonary surfactant, lung function, and endobronchial inflammation in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170: 1000-1005, 2004.

37. **Griese M, Felber J, Reiter K, Strong P, Reid K, Belohradsky BH, Jäger G and Nicolai T.** Airway inflammation in children with tracheostomy. *Pediatr Pulmonol* 37: 356-361, 2004.
  
38. **Griese M, Maderlechner N, Ahrens P and Kitz R.** Surfactant proteins A and D in children with pulmonary disease due to gastroesophageal reflux. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165: 1546-1550, 2002.
  
39. **Griese M, Wiesener A, Lottspeich F and v.Bredow C.** Limited proteolysis of surfactant protein D causes a loss of its calcium-dependent lectin functions. *Biochim Biophys Acta* 1638: 157-163, 2003.
  
40. **Hartl D and Griese M.** Surfactant protein D in human lung diseases. *Eur J Clin Invest* 36: 423-435, 2006.
  
41. **Hartl D, Griese M, Nicolai T, Zissel G, Prell C, Konstantopoulos N, Gruber R, Reinhardt D, Schendel DJ and Krauss-Etschmann S.** Pulmonary chemokines and their receptors differentiate children with asthma and chronic cough. *J Allergy Clin Immunol* 115: 728-736, 2005.
  
42. **Hayashi J, Masaka T and Ishikawa I.** Increased levels of soluble CD14 in sera of periodontitis patients. *Infect Immun* 67: 417-420, 1999.

43. **Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R and Goyert SM.** The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol inkage. *J Immunol* 141: 547-552, 1988.
  
44. **Henson PM and Johnston RB, Jr.** Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* 79: 669-674, 1987.
  
45. **Hiki N, Berger D, Dentener MA, Mimura Y, Buurman WA, Prigl C, Seidelmann M, Tsuji E, Kaminishi M and Beger H.** Changes in Endotoxin-Binding Proteins during Major Elective Surgery: Important Role for Soluble CD14 in Regulation of Biological Activity of Systemic Endotoxin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6: 844-850, 1999.
  
46. **Hoheisel G, Zheng L, Teschler H, Striz I and Costabel U.** Increased soluble CD14 levels in BAL fluid in pulmonary tuberculosis. *Chest* 108: 1614-1616, 1995.
  
47. **Honda Y, Kuroki Y, Matsuura E, Nagae H and Takahashi H.** Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 1860-1866, 1995.
  
48. **Honda Y, Takahashi H, Kuroki Y, Akino T and Abe S.** Decreased contents of surfactant proteins A and D in BAL fluids of healthy smokers. *Chest* 109: 1006-1009, 1996.

49. **Ihn H, Asano Y, Kubo M, Yamane K, Jinnin M, Yazawa N, Fujimoto M and Tamaki K.** Clinical significance of serum surfactant protein D (SP-D) in patients with polymyositis/dermatomyositis: correlation with interstitial lung disease. *Rheumatology* 41: 1268-1272, 2002.
  
50. **Janssen R, Grutters JC, Sato H, Velzen-Blad H, Zanen P, Kohno N, Welsh KI, du Bois RM and van den Bosch JMM.** Analysis of KL-6 and SP-D as disease markers in bird fancier's lung. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases* 22: 51-57, 2005.
  
51. **Janssen R, Sato H, Grutters JC, Bernard A, Velzen-Blad H, du Bois RM and van den Bosch JMM.** Study of Clara cell 16, KL-6, and surfactant protein-D in serum as disease markers in pulmonary sarcoidosis. *Chest* 124: 2119-2125, 2003.
  
52. **Kerr MH and Paton JY.** Surfactant protein levels in severe respiratory syncytial virus infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 159: 1115-1118, 1999.
  
53. **Kirchner KK, Wagener JS, Khan TZ, Copenhaver SC and Accurso FJ.** Increased DNA levels in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1426-1429, 1996.

54. **Kishore U, Greenhough T, Waters P, Shrive A, Ghai R, Kamran M, López A, Reid K, Madan T and Chakraborty T.** Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors. *J Molecular Immunology* 2005.
55. **Knapp W, Dorken B, Rieber P, Schmidt RE, Stein H and von dem Borne AE.** CD antigens 1989. *Blood* 74: 1448-1450, 1989.
56. **Koletzko B.** *Kinderheilkunde und Jugendmedizin.* Springer Verlag, 2004.
57. **Koopmans JG, van der Zee JS, Krop EJM, Lopuhaa CE, Jansen HM and Batenburg JJ.** Serum surfactant protein D is elevated in allergic patients. *Clinical and Experimental Allergy* 34: 1827-1833, 2004.
58. **Krane M and Griesse M.** Surfactant protein D in serum from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *European Respiratory Journal* 22: 592-595, 2003.
59. **Kruger C, Schutt C, Obertacke U, Joka T, Muller FE, Knoller J, Koller M, König W and Schonfeld W.** Serum CD14 levels in polytraumatized and severely burned patients. *Clin Exp Immunol* 85: 297-301, 1991.
60. **Labeta MO, Landmann R, Obrecht JP and Obrist R.** Human B cells express membrane-bound and soluble forms of the CD14 myeloid antigen. *Mol Immunol* 28: 115-122, 1991.

61. **Landmann R, Knopf H, Link S, Sansano S, Schumann R and Zimmerli W.** Human Monocyte CD14 Is Upregulated by Lipopolysaccharide. *Infection and Immunity* 64: 1762-1769, 1996.
  
62. **Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP and Calandra T.** Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis* 171: 639-644, 1995.
  
63. **Lawn SD, Labeta MO, Arias M, Acheampong JW and Griffin GE.** Elevated serum concentrations of soluble CD14 in HIV- and HIV+ patients with tuberculosis in Africa: prolonged elevation during anti-tuberculosis treatment. *Clin Exp Immunol* 120: 483-487, 2000.
  
64. **LeVine AM, Whitsett JA, Hartshorn KL, Crouch EC and Korfhagen TR.** Surfactant protein D enhances clearance of influenza A virus from the lung in vivo. *Journal of Immunology* 167: 5868-5873, 2001.
  
65. **Lien E, Aukrust P, Sundan A, Muller F, Froland SS and Espevik T.** Elevated levels of serum-soluble CD14 in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: correlation to disease progression and clinical events. *Blood* 92: 2084-2092, 1998.
  
66. **Lin B, Noring R, Steere AC, Klempner MS and Hu LT.** Soluble CD14 levels in the serum, synovial fluid, and cerebrospinal fluid of patients with various stages of Lyme disease. *J Infect Dis* 181: 1185-1188, 2000.



67. **Luster AD.** Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338: 436-445, 1998.
68. **Madan T, Eggleton P, Kishore U, Strong P, Aggrawal SS, Sarma PU and Reid KM.** Binding of surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect Immun* 65: 3171-3179, 1997.
69. **Madsen J, Kliem A, Tornøe I, Skjødtt K, Koch C and Holmskov U.** Localisation of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol* 164: 5866-5870, 2000.
70. **Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui LC, Shi X, Gregor P and .** Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* 29: 335-344, 1995.
71. **Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM and Wright JR.** *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 528-537, 2003.
72. **Martin AC, Laing IA, Zhang G, Brennan S, Winfield K, Sly PD, Stick SM, Goldblatt J and LeSouef PN.** CD14 C-159T and early infection with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *Respir Res* 6: 63, 2005.

73. **Martin TR, Rubenfeld GD, Ruzinski JT, Goodman RB, Steinberg KP, Leturcq DJ, Moriarty AM, Raghu G, Baughman RP and Hudson LD.** Relationship between soluble CD14, lipopolysaccharide binding protein, and the alveolar inflammatory response in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 937-944, 1997.
74. **Mason R, Greene K and Voelker DR.** Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am J Physiol* 275: L1-L13, 1998.
75. **McCormack FX and Whitsett JA.** The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest* 109: 707-712, 2002.
76. **Moser B.** Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunology* 2: 123-128, 2001.
77. **Murray CJ and Lopez AD.** Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349: 1436-1442, 1997.
78. **Murray CJ, Lopez AD and Jamison DT.** The global burden of disease in 1990: summary results, sensitivity analysis and future directions. *Bull World Health Organ* 72: 495-509, 1994.
79. **Ni M, Evans DJ, Hawgood S, Anders EM, Sack RA and Fleiszig SMJ.** Surfactant protein D is present in human tear fluid and the cornea and inhibits

- epithelial cell invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 73: 2147-2156, 2005.
80. **Nickel R, Lau S, Niggemann B, Gruber C, von Mutius E, Illi S, Kulig M and Wahn U.** Messages from the German Multicentre Allergy Study. *Pediatr Allergy Immunol* 13 Suppl 15: 7-10, 2002.
81. **Noah T, Murphy PC, Alink JJ, Leigh MW, Hull WM, Stahlman MT and Whitsett J.A.** Bronchoalveolar lavage fluid SP-A and SP-D are inversely related to inflammation in early cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 685-691, 2003.
82. **Nocker RE, Schoonbrood DF, van de Graaf EA, Hack CE, Lutter R, Jansen HM and Out TA.** Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol* 109: 183-191, 1996.
83. **Nockher WA, Bergmann L and Scherberich JE.** Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 98: 369-374, 1994.
84. **Nockher WA, Wigand R, Schoeppe W and Scherberich JE.** Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 96: 15-19, 1994.

85. **O'Connell EJ.** The burden of atopy and asthma in children. *Allergy* 59 Suppl 78: 7-11, 2004.
  
86. **Palaniyar N, Clark H, Nadesalingam J, Shih MJ, Hawgood S and Reid K.**  
Innate Immune Collectin Surfactant Protein D Enhances the Clearance of DNA  
by Macrophages and Minimizes Anti-DNA Antibody Generation. *J Immunol* 174:  
7352-7358, 2005.
  
87. **Palaniyar N, Clark H, Nadesalingama J, Hawgood S and Reid KBM.**  
Surfactant protein D binds genomic DNA and apoptotic cells, and enhances their  
clearance, in vivo. *Apoptosis: from Signaling Pathways to Therapeutic Tools*  
1010: 471-475, 2003.
  
88. **Palaniyar N, Nadesalingam J and Reid KBM.** Pulmonary innate immune  
proteins and receptors that interact with gram-positive bacterial ligands.  
*Immunobiology* 205: 575-594, 2002.
  
89. **Pforte A, Schiessler A, Gais P, Beer B, Ehlers M, Schutt C and  
ZieglerHeitbrock HWL.** Expression of Cd14 Correlates with Lung-Function  
Impairment in Pulmonary Sarcoidosis. *Chest* 105: 349-354, 1994.
  
90. **Pforte A, Schiessler A, Gais P, Beer B, Strobel M, Ehlers M, Schutt C and  
Ziegler-Heitbrock HW.** Increased expression of the monocyte differentiation  
antigen CD14 in extrinsic allergic alveolitis. *Monaldi Arch Chest Dis* 48: 607-612,  
1993.

91. **Pham CT.** Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* 6: 541-550, 2006.
  
92. **Postle AD, Mander A, Reid KBM, Wang JY, Wright SM, Moustaki M and Warner JO.** Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20: 90-98, 1999.
  
93. **Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B and Mackay CR.** The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101: 746-754, 1998.
  
94. **Ratjen F, Hartog CM, Paul K, Wermelt J and Braun J.** Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha. *Thorax* 57: 930-934, 2002.
  
95. **Restrepo CI, Dong Q, Savov J, Mariencheck WI and Wright JR.** Surfactant protein D stimulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 21: 576-585, 1999.
  
96. **Reynolds HY and Huck JL.** Immunologic responses in the lung. *Respiration* 57: 221-228, 1990.

97. **Sano H, Chiba H, Iwaki D, Sohma H, Voelker DR and Kuroki Y.** Surfactant proteins A and D bind CD14 by different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 275: 22442-22451, 2000.
  
98. **Schopf RE, Dobmeyer J, Dobmeyer T and Morsches B.** Soluble CD14 monocyte antigen in suction blister fluid and serum of patients with psoriasis. *Dermatology* 186: 45-49, 1993.
  
99. **Schutt C.** CD14. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 545-549, 1999.
  
100. **Senft AP, Korfhagen TR, Whitsett JA, Shapiro SD and LeVine AM.** Surfactant protein-D regulates soluble CD14 through matrix metalloproteinase-12. *J Immunol* 174: 4953-4959, 2005.
  
101. **Striz I, Mio T, Adachi Y, Bazil V and Rennard S.** The CD14 molecule participates in regulation of IL-8 and IL-6 release by bronchial epithelial cells. *Immunology Letters* 62: 177-181, 1998.
  
102. **Striz I, Zheng L, Wang YM, Pokorna H, Bauer PC and Costabel U.** Soluble CD14 is increased in bronchoalveolar lavage of active sarcoidosis and correlates with alveolar macrophage membrane-bound CD14. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 544-547, 1995.
  
103. **Takahashi H, Imai Y, Fujishima T, Shiratori M, Murakami S, Chiba H, Kon H, Kuroki Y and Abe S.** Diagnostic significance of surfactant proteins A and D in

- sera from patients with radiation pneumonitis. *European Respiratory Journal* 17: 481-487, 2001.
104. **Troelstra A, Giepmans BN, van Kessel KP, Lichenstein HS, Verhoef J and van Strijp JA.** Dual effects of soluble CD14 on LPS priming of neutrophils. *J Leukoc Biol* 61: 173-178, 1997.
105. **Tumgor G, Celik U, Alabaz D, Cetiner S, Yaman A, Yildizdas D and Alhan E.** Aetiological agents, interleukin-6, interleukin-8 and CRP concentrations in children with community- and hospital-acquired pneumonia. *Ann Trop Paediatr* 26: 285-291, 2006.
106. **v.Bredow C, Wiesener A and Griese M.** Proteolysis of surfactant protein D by cystic fibrosis relevant proteases. *Lung* 181: 79-88, 2003.
107. **Van Voorhis WC, Steinman RM, Hair LS, Luban J, Witmer MD, Koide S and Cohn ZA.** Specific antimononuclear phagocyte monoclonal antibodies. Application to the purification of dendritic cells and the tissue localization of macrophages. *J Exp Med* 158: 126-145, 1983.
108. **Virchow JC, Julius P, Matthys H, Kroegel C and Luttmann W.** CD14 expression and soluble CD14 after segmental allergen provocation in atopic asthma. *European Respiratory Journal* 11: 317-323, 1998.

109. **Voorhout W, Veenendaal T., Kuroki Y., Ogasawara Y., van Golde L and Geuze HJ.** Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem* 40: 1589-1597, 1992.
110. **Wang JY, Kishore U, Lim BL, Strong P and Reid KBM.** Interaction of human lung surfactant proteins A and D with mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *Clinical and Experimental Immunology* 106: 367-373, 1996.
111. **Ward C, Walters EH, Zheng L, Whitford H, Williams TJ and Snell GI.** Increased soluble CD14 in bronchoalveolar lavage fluid of stable lung transplant recipients. *Eur Respir J* 19: 472-478, 2002.
112. **Weiss SJ.** Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365-376, 1989.
113. **Wenisch C, Wenisch H, Parschalk B, Vanijanonta S, Burgmann H, Exner M, Zedwitz-Liebenstein K, Thalhammer F, Georgopoulos A, Graninger W and Looareesuwan S.** Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol* 105: 74-78, 1996.
114. **Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC and Mattick JS.** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295: 1487, 2002.
115. **White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, Widdowson K, Foley JJ, Martin LD, Griswold DE and Sarau HM.** Identification



- of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem* 273: 10095-10098, 1998.
116. **Wolter JM, Rodwell RL, Bowler SD and McCormack JG.** Cytokines and inflammatory mediators do not indicate acute infection in cystic fibrosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 260-265, 1999.
117. **Wong CJ, Akiyama J, Allen L and Hawgood S.** Localization and developmental expression of surfactant proteins D and A in the respiratory tract of the mouse. *Pediatric Research* 39: 930-937, 1996.
118. **Wright JR.** Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 77: 931-961, 1997.
119. **Wright SD, Ramos RA, Hermanowski-Vosatka A, Rockwell P and Detmers PA.** Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J Exp Med* 173: 1281-1286, 1991.
120. **Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ and Mathison JC.** CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433, 1990.

121. **Zaas AK and Schwartz DA.** Innate immunity and the lung: defense at the interface between host and environment. *Trends Cardiovasc Med* 15: 195-202, 2005.
122. **Zhang L, Ikegami M, Crouch E, Korfhagen T and Whitsett JA.** Activity of pulmonary surfactant protein D (SP-D)) in vivo is dependent on oligomeric structure. *Am J Respir Crit Care Med* 163: A729, 2001.
123. **Zychlinsky A, Weinrauch Y and Weiss J.** Introduction: Forum in immunology on neutrophils. *Microbes and Infection* 5: 1289-1344, 2003.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABPA	Allergische Bronchopulmonale Aspergillose
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL(F)	Bronchoalveoläre Lavage (Flüssigkeit)
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
(s)/(m) CD14	(soluble)/(membrane-associated) CD14
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EAA	Exogen Allergische Alveolitis
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	Fetales Bovines Serum
FEV1	Forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen
fMLP	Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

FVC	Forcierte Vitalkapazität
GÖR	Gastroösophagealer Reflux
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
Ig(G)	Immunglobulin (G)
IL (-8)	Interleukin (-8)
ILD	Interstitial Lung Disease
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
IQR	Interquartile range (Interquartilabstand)
kDA	Kilo Dalton
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LD	Lung Disease
LPS	Lipopolysaccharide
LTX	Lungentransplantation
M	Mol
MAPK	mitogen-activated-protein kinase
MBP	Mannose binding protein
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MMP	Matrixmetalloprotease
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
OD	Optische Dichte
OP	Operation
PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
PBS	Phosphate buffered saline

PGN	Peptidoglykan
PMA	Phorbol myristate acetate
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RAST	Radio Allergo Sorbent Test
RSV	Respiratory Syncycial Virus
SIRP $\alpha$	Signal inhibitory regulatory protein alpha
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SP (-D)	Surfactant Protein (-D)
TLC	Totale Lungenkapazität
TLR	Toll like receptor
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
U	Unit
V	Volt

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Struktur des Surfactant Protein D (74).....	7
Abbildung 1-2 mCD14 ist ein Oberflächenrezeptor auf myeloiden Zellen und bindet LPS, PGN und andere bakterielle Bestandteile (1). Es induziert die Aufnahme dieser Bestandteile und fördert die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen (2). CD14 wird bei Zellaktivierung von der Membran abgespalten und interagiert als lösliche Form (sCD14) ebenfalls mit bakteriellen Bestandteilen (3). sCD14 fördert ihre Aufnahme durch Phagozyten (4) und die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch CD14 negative Zellen (z.B. Endothelzellen) (5). SP-D kann sowohl bakterielle Bestandteile abfangen, als auch sCD14 binden und wirkt dadurch anti-inflammatorisch (6). .....	10
Abbildung 3-1 Schema zur Dichtegradientenzentrifugation .....	23
Abbildung 3-2 Prinzip der Chemilumineszenzreaktion.....	29
Abbildung 3-3 Prinzip der Fluoreszenzdetektion.....	31
Abbildung 4-1 SP-D Konzentrationen in der BALF .....	36
Abbildung 4-2 SP-D Konzentrationen im Serum.....	37
Abbildung 4-3 sCD14 Konzentrationen in der BALF .....	38
Abbildung 4-4 sCD14 Konzentrationen im Serum .....	39
Abbildung 4-5 sCD14 Konzentration im Serum und in der BALF bei CF .....	40
Abbildung 4-6 sCD14 Konzentration im Serum und in der BALF bei Pneumonie.....	40
Abbildung 4-7 sCD14 Konzentration im Serum und in der BALF bei Asthma.....	41
Abbildung 4-8 sCD14 Konzentration im Serum und in der BALF bei den Kontrollpatienten.....	41
Abbildung 4-9 sCD14 Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Stimulation von Neutrophilen Granulozyten mit bakteriellen Liganden für 40 Stunden bei 37°C ....	42
Abbildung 4-10 IL-8 Konzentrationen in der BALF.....	43
Abbildung 4-11 IL-8 Konzentrationen im Serum .....	44
Abbildung 4-12 Konzentration der freien DNA in der BALF .....	45
Abbildung 4-13 Korrelation der freien DNA zu SP-D in der BALF von CF Patienten ....	46
Abbildung 4-14 Korrelation der freien DNA zu SP-D in der BALF von Pneumonie Patienten .....	46
Abbildung 4-15 Korrelation der freien DNA zu SP-D in der BALF von Asthma Patienten .....	47

Abbildung 4-16 Korrelation der freien DNA zu SP-D in der BALF von Kontrollpatienten .....	47
Abbildung 4-17 Korrelation der sCD14 Spiegel in der BALF zu sCD14 Spiegel in im Serum bei CF Patienten .....	48
Abbildung 4-18 Korrelation der sCD14 Spiegel in der BALF zu sCD14 Spiegel in im Serum bei Pneumonie Patienten .....	48
Abbildung 4-19 Korrelation der sCD14 Spiegel in der BALF zu sCD14 Spiegel in im Serum bei Asthma Patienten .....	49
Abbildung 4-20 Korrelation der sCD14 Spiegel in der BALF zu sCD14 Spiegel in im Serum bei Kontrollpatienten .....	49
Abbildung 4-21 CCR5 und CXCR3 Expression auf der Oberfläche von Neutrophilen Granulozyten aus BAL von Patienten mit CF, Pneumonie oder Asthma bzw. von Kontrollen, dargestellt in MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) .....	50
Abbildung 4-22 Darstellung der Bandenintensität nach CCR5 und CXCR3 Detektion im Zelllysate von stimulierten und unstimulierten Neutrophilen Granulozyten durch Western Blot. Die Balken spiegeln die Bandenintensität in % der Maximalintensität nach PMA Stimulation wider .....	51
Abbildung 4-23 Western Blot Banden nach CCR5 Detektion im Zelllysate von stimulierten und unstimulierten Neutrophilen Granulozyten. CCR5 ist ca. 40kDa groß .....	53
Abbildung 4-24 Western Blot Banden nach CXCR3 Detektion im Zelllysate von stimulierten und unstimulierten Neutrophilen Granulozyten. CXCR3 ist ca. 40kDa groß die kleinere Isoform ca. 38kDa .....	53
Abbildung 4-25 Oberflächenverteilung von CXCR3 und CCR5 sowohl auf unstimulierten Neutrophilen Granulozyten, als auch nach 30 min Stimulation mit fMLP. Der Zellkern ist mit DAPI blau gefärbt, die Zellmembran mit ConA grün. Die Rezeptoren leuchten rot .....	54
Abbildung 4-26 Intrazelluläre Verteilung von CXCR3 und CCR5 bei unstimulierten Blutneutrophilen als Nahaufnahme und im Überblick. Die Zellen wurden permeabilisiert. Der Zellkern ist mit DAPI blau gefärbt, die Rezeptoren leuchten grün. Die Zellmembran wurde nicht gefärbt .....	55
Abbildung 4-27 Verteilung der Rezeptoren CXCR3 und CCR5 in ruhenden Blutneutrophilen und Lungenneutrophilen von CF Patienten. Die Zellmembran ist mit ConA grün gefärbt, die Rezeptoren leuchten rot .....	56

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Funktionen von SP-D (17).....	8
Tabelle 3-1 klinische Daten zu den untersuchten Patientengruppen .....	33
Tabelle 4-1 SP-D Spiegel in der BALF (angegeben in ng/ml).....	36
Tabelle 4-2 SP-D Spiegel im Serum (angegeben in ng/ml) .....	37
Tabelle 4-3 sCD14 Spiegel in der BALF (angegeben in ng/ml) .....	38
Tabelle 4-4 sCD14 Spiegel im Serum (angegeben in ng/ml).....	39
Tabelle 4-5 IL-8 Spiegel in der BALF (angegeben in pg/ml) .....	43
Tabelle 4-6 IL-8 Spiegel im Serum (angegeben in pg/ml).....	44
Tabelle 4-7 freie DNA Spiegel in der BALF (angegeben in ng/ml).....	45
Tabelle 5-1 sCD14 Messungen in der BALF.....	60
Tabelle 5-2 sCD14 Messungen im Serum .....	62
Tabelle 5-3 Surfactant Protein D Level in der BALF (40).....	66
Tabelle 5-4 Surfactant Protein D Level im Serum (40) .....	67



## 8.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. Dominik Hartl für die Überlassung des Themas und seine unermüdlich engagierte und kompetente Betreuung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Seine nette, aufgeweckte Art und die stets konstruktive Kritik haben mich immer motiviert.

Herrn Prof. Dr. med. M. GRIESE, meinem Doktorvater, möchte ich dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat meine Doktorarbeit in seiner Forschungsgruppe Lunge anzufertigen. Ich danke ihm für sein Interesse und die Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhardt, Direktor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Institut verfassen zu können.

Herrn PD Dr. F. Ebel vom Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München möchte für die Unterstützung bei der Benutzung des Konfokalmikroskops danken.

Herrn Dr. M. Woischnik und Frau C. Sparr danke ich ganz herzlich für die kompetente Beratung bei all meinen Fragen zur Zellkultur.

Bei unseren TAs A. Schams und S. Gruschka, sowie allen meinen Mitdoktoranden/innen möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit und eine schöne Zeit im Labor bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Bruder für die geduldige Unterstützung bei der Arbeit mit dem Computer und meiner Mutter für das Korrekturlesen und ihre konstruktiven Beiträge.

## 8.5 Publikationen

1. Vitaly Starosta, Richard Kitz, Dominik Hartl, **Veronica Marcos**, Dietrich Reinhardt and Matthias Griesse:

„Bronchoalveolar Pepsin, Bile Acids, Oxidation, and Inflammation in Children With Gastroesophageal Reflux Disease“

*Chest*; 132; 5; 1557-1564; November 2007

2. Dominik Hartl, Philipp Latzin, Peter Hordijk, **Veronica Marcos**, Carsten Rudolph, Markus Woischnik, Susanne Krauss-Etschmann, Barbara Koller, Dietrich Reinhardt, Adelbert A. Roscher, Dirk Roos & Matthias Griesse:

„Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease“

*Nature Medicine*; 13; 12; 1423-1430; Dezember 2007

3. Dominik Hartl, Susanne Krauss-Etschmann, Barbara Koller, Peter L. Hordijk, Taco W. Kuijpers, Florian Hoffmann, Andreas Hector, Ernst Eber, **Veronica Marcos**, Iris Bittmann, Oliver Eickelberg, Matthias Griesse and Dirk Roos:

„Infiltrated Neutrophils Acquire Novel Chemokine Receptor Expression and Chemokine Responsiveness in Chronic Inflammatory Lung Diseases“

*Journal of Immunology*; 181; 11; 8053-8067; Dezember 2008

## 8.6 Lebenslauf

### Zur Person

Geburtsdatum: 07.03.1983  
Geburtsort: Lübeck  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung

1989 - 1993: Volksschule, Zeitlarn  
1993 - 1997: Von- Müller-Gymnasium, Regensburg  
1997 - 1999: Gymnasium Maria Königin, Lennestadt  
1999 - 2000: Deutsche Schule Madrid, Spanien  
2000 - 2002: Gymnasium Maria Königin, Lennestadt  
Abiturnote: 1,3

### Studium

2002 - 2008: Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
09/04: Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,0)  
11/08: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)

### Famulaturen

03/05: Innere Medizin: St. Georg Krankenhaus, Schmallenberg  
03/06: Gynäkologie: Hospital of Seychelles, Mahé, Seychellen  
08/06 - 09/06: Ambulanz / Pädiatrie: Christiane Herzog Ambulanz für Cystische Fibrose im Dr. von Haunerschen Kinderspital, München  
03/07: Pädiatrie: Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires, Argentinien

### Praktisches Jahr

- 08/07 - 12/07: Innere Medizin: Klinik Augustinum München, Lehrkrankenhaus der LMU; Rotationen: Kardiologie / Gastroenterologie
- 12/07 - 03/08: Chirurgie: Kinderchirurgische Klinik und Kinderpoliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals München; Rotation: Allgemeine Kinderchirurgie
- 03/08 - 07/08: Pädiatrie: Kinderklinik und Kinderpoliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals München; Rotationen: Ambulanz / Allgemeine Pädiatrie / Neonatologie / Knochenmarktransplantationsstation

### Ärztliche Tätigkeit

- Seit 02/09 Anstellung am Dr. von Haunerschen Kinderspital München als Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Assistenzärztin

### Fremdsprachen

- Spanisch: fließend in Wort und Schrift
- Englisch: fließend in Wort und Schrift
- Französisch: Grundkenntnisse
- Latein Latinum

### Sonstige Aktivitäten

- Violine: langjährige Orchestermemberschaft im „STudenten ORCHester München“ („STORCH“)

München, Mai 2009